

**PEMANFAATAN XILAN ASAL TONGKOL JAGUNG  
SEBAGAI SUMBER KARBON DAN INDUSER UNTUK  
PRODUKSI ENZIM XILANOLITIK DARI *Escherichia coli*  
REKOMBINAN CAMPURAN [*GbtXyl43B*] DAN [*abfa51*]**

**SKRIPSI**



**JATMIKO EFENDI**

**PROGRAM STUDI S-1 KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2016**

**PEMANFAATAN XILAN ASAL TONGKOL JAGUNG  
SEBAGAI SUMBER KARBON DAN INDUSER UNTUK  
PRODUKSI ENZIM XILANOLITIK DARI *Escherichia coli*  
REKOMBINAN CAMPURAN [*GbtXyl43B*] DAN [*abfa51*]**

**SKRIPSI**



**JATMIKO EFENDI**

**PROGRAM STUDI S-1 KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2016**

PEMANFAATAN XILAN ASAL TONGKOL JAGUNG  
SEBAGAI SUMBER KARBON DAN INDUKSIER UNTUK PRODUKSI  
ENZIM XILANOKSIK DARI *Escherichia coli* REKOMBINAN  
CAMPURAN [G6P43B] DAN [oxyr51]

SKRIPSI

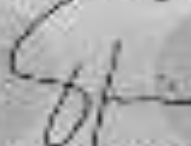
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh  
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia pada  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Airlangga

Oleh:

**JATMIKO EFENDI**  
NIM. 081211531014

Disetujui oleh:

Pembimbing I



**Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspawati, M.Si**  
NIP. 19630615 198701 2 001

Pembimbing II



**Prof. Dr. Afaf Bakhtir, M.S**  
NIP. 19561014 198303 2 001

## LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : PEMANFAATAN XILAN ASAL TONGKOL JAGUNG  
SEBAGAI SUMBER KARBON DAN INDUSER UNTUK  
PRODUKSI ENZIM XILANOLITIK DARI *Escherichia coli*  
REKOMBINAN CAMPURAN [GbcYJ43H] DAN [abfA51]

Penyusun : Jatmiko Efendi

Pembimbing I : Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Purpaningsih, M.Si

Pembimbing II : Prof. Dr. Afaf Bakhtir, M.S

Tanggal Ujian : 27 Juli 2016

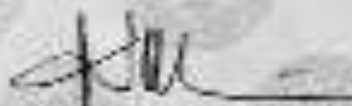
Ditstgiri oleh:

Pembimbing I



Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Purpaningsih, M.Si  
NIP. 19630615 198701 2 001

Pembimbing II



Prof. Dr. Afaf Bakhtir, M.S  
NIP. 19561014 198303 2 001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi S-1 Kimia  
Departemen Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Airlangga



Dr. Purkan, M.Si  
NIP. 19721116 199702 1 001

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

**Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.**



## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, berkat limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penyusunan naskah skripsi yang berjudul “Pemanfaatan Xilan dari Tongkol Jagung Sebagai Sumber Karbon dan Induser Untuk Produksi Enzim Xilanolitik dari *Escherichia Coli* Rekombinan Campuran [*GbtXyl43b*] dan [*abfa51*]” ini dengan baik. Semoga sholat dan salam akan selalu tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya.

Naskah skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Dalam penulisan dan penyusunan naskah skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan, serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis dengan senang hati menyampaikan banyak terimakasih kepada yang terhormat:

1. Dr. Purkan, M.Si selaku Ketua Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin kepada penulis untuk menyusun naskah skripsi ini.
2. Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si selaku Pembimbing I yang selalu bijaksana dalam memberikan nasihat, arahan, dan waktunya dalam proses penyusunan naskah skripsi ini.
3. Prof. Dr. Afat Baktir, MS, Apt selaku Pembimbing II yang selalu bijaksana dalam memberikan nasihat, arahan, dan waktunya dalam proses penyusunan naskah skripsi ini.
4. Drs. Handoko Darmokoesdono, DEA, sebagai dosen wali yang selalu memberikan perhatian, semangat, dan bimbingan kepada penulis.
5. Ayah, Ibu, serta keluarga yang penuh cinta atas jasa-jasanya, kesabaran, doa, dan tidak pernah lelah dalam mendidik dan memberi cinta yang tulus dan ikhlas kepada penulis semenjak kecil.
6. Rekan-rekan seperjuangan atas kebersamaan, kasih sayang, dan berbagai bantuan baik secara moril maupun materiil demi lancarnya penyusunan naskah skripsi ini.
7. Siti Muharromah yang selalu memberikan kasih sayang, dorongan, semangat, motivasi, dan doa kepada penulis.
8. Rahmat Eko Sanjaya, M.Si beserta seluruh staff Laboratorium Proteomik LPT Universitas Airlangga yang tidak henti-hentinya membimbing, mengajarkan, serta memberikan masukan yang sangat membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian dan juga menyusun naskah skripsi ini.
9. Seluruh laboran, tenaga ahli, dan tenaga administrasi Departemen Kimia dan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang selalu memberikan waktunya untuk membantu penulis dalam menyelesaikan penyusunan naskah skripsi ini.
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Semoga segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis menyadari dalam penulisan naskah skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi menyempurnakan naskah skripsi ini, sehingga dapat memberikan manfaat dan sumbangan ilmiah yang sebesar-besarnya khususnya bagi penulis dan umumnya bagi kita semua.

Surabaya, Agustus 2016

Penulis



**Efendi, J., 2016, Pemanfaatan Xilan dari Tongkol Jagung sebagai Sumber Karbon dan Induser untuk Produksi Enzim Xilanolitik dari *Escherichia coli* Rekombinan Campuran [*GbtXyl43b*] dan [*abfa51*]. Skripsi Ini Dibawah Bimbingan Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si, dan Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S. Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.**

## ABSTRAK

Limbah tongkol jagung mengandung 30,91% hemiselulosa atau xilan. Xilan pada tongkol jagung dapat diekstraksi dalam suasana basa dan mengendap dengan penambahan asam. Freeze drying dibutuhkan untuk mendapatkan xilan kering yang bebas pelarut. Ekstrak xilan dimanfaatkan sumber karbon dan induser untuk produksi enzim xilanolitik dari *E. coli* rekombinan campuran [*GbtXyl43B*] dan [*abfa51*]. Pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran pada media alternatif MTM-X1:3 dan MTM-X1:1 lebih baik dibandingkan dengan media kontrol MTM dengan menggunakan metode pengukuran OD<sub>600</sub>. Aktivitas enzim xilanolitik pada media alternatif MTM-X1:3 dan MTM-X1:1 lebih rendah dibandingkan dengan media kontrol MTM dengan menggunakan metode Pereaksi DNS. Sedangkan pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran pada media kontrol MTM-X menunjukkan fase adaptasi yang panjang sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut.

**Kata kunci:** tongkol jagung, hemiselulosa, xilan, xilanolitik, media terdefinisi.



**Efendi, J., 2016, Utilization of Corncob Xylan as Carbon Source and Inducer for Xylanolytic Enzyme Production from Mixed Recombinant *Escherichia coli* [*GbtXyl43B*] and [*abfa51*]. This Scription is Under Advisement of Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si, and Prof. Dr. Afaf Baktir, M.S. Departemen of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya.**

---

## ABSTRACT

Corncoobs waste contains as much as 30.91% of hemicellulose or xylan. Xylan on corncoobs can be extracted under alkaline conditions and precipitated by the addition of acid. Freeze drying is needed to get the solvent free of dry xylan. Xylan extract used as carbon source and inducer for xylanolytic enzyme production from mixed recombinant *E. coli* [*GbtXyl43B*] and [*abfa51*]. Growth of mixed recombinant *E. coli* in MTM-X1:3 and MTM-X1:1 alternative medium is better than MTM control medium by OD600 measurement method. Xylanolytic enzyme activity in MTM-X1:3 and MTM-X1:1 alternative medium is less than MTM control medium by DNS Reagen method. However, growth of mixed recombinant *E. coli* in MTM-X control medium shows a long phase of adaptation period, so further research is needed.

**Keywords:** *corncoobs, hemicellulose, xylan, xylanolytic, defined medium.*

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PERNYATAAN .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1 Biomassa .....	7
2.2 Limbah Tongkol Jagung .....	7
2.3 Xilan.....	8
2.4 Enzim Xilanase .....	9
2.4.1 Klasifikasi Enzim Xilanase .....	10
2.4.2 Aplikasi Xilanase Dalam Biokonversi Limbah Pertanian .....	11
2.5 Media Kultur .....	12
2.5.1 Komponen Media Kultur .....	13
2.5.2 Jenis Media Kultur .....	14
2.6 <i>GbtXyl43B</i> .....	15
2.7 Enzim $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.....	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....	20
3.1 Waktu dan Tempat.....	20
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	20
3.2.1 Sampel Penelitian.....	20
3.2.2 Bahan Penelitian .....	20
3.2.3 Alat Penelitian.....	21
3.3 Diagram Alir Penelitian .....	21
3.4 Prosedur Penelitian .....	21
3.4.1 Isolasi Xilan dari Tongkol Jagung .....	21
3.4.2 Pembuatan Media Produksi .....	22
3.4.3 Pertumbuhan <i>E. coli</i> rekombinan campuran .....	23
3.4.4 Isolasi Enzim Xilanolitik .....	23
3.4.5 Uji Aktivitas Enzim Xilanolitik .....	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	25
4.1 Isolasi Xilan dari Tongkol Jagung .....	25

4.2 Pertumbuhan <i>E. coli</i> Rekombinan Campuran.....	30
4.2.1 Profil Kurva Pertumbuhan .....	34
4.2.2 Perbandingan Profil Kurva Pertumbuhan dari Semua Media .....	39
4.3 Aktivitas Enzim Xilanolitik .....	46
4.3.1 Profil Aktivitas Enzim Xilanolitik .....	48
4.3.2 Perbandingan Aktivitas Enzim Xilnase dari Semua Media .....	50
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	55
5.1 Kesimpulan .....	55
5.2 Saran .....	56
DAFTAR PUSTAKA .....	57
LAMPIRAN.....	62



---

**DAFTAR GAMBAR**


---

<b>Nomor</b>	<b>Nama Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1	Struktur xilan dan lokasi penyerangan enzim xilanolitik (Dood et al., 2011)	9
2.2	<i>GbtXyl43B</i> mengandung CBM dan CM (Puspaningsih, 2004; Ratnadewi, 2013)	16
2.3	Analisis filogenetik CBM dari <i>GbtXyl43B</i> dan kaitannya dengan urutan asam amino dari famili CBM (Puspaningsih, 2004; Ratnadewi, 2013)	17
4.1	Serbuk ekstrak xilan hasil isolasi dari tongkol jagung	29
4.2	Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i> rekombinan campuran dalam media MTM	35
4.3	Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i> rekombinan campuran dalam media MTM-X1:3	36
4.4	Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i> rekombinan campuran dalam media MTM-X1:1	37
4.5	Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i> rekombinan campuran dalam media MTM-X	38
4.6	Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i> rekombinan campuran dalam media MTM, MTM-X1:3, MTM-X1:1, dan MTM-X	39
4.7	Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i> rekombinan campuran dalam media MTM yang mengandung 0% glukosa (Sanjaya, 2016)	42
4.8	Aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM	50
4.9	Aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X1:3	50
4.10	Aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X1:1	50
4.11	Aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X	50
4.12	Aktivitas enzim xilanolitik pada berbagai variasi media	51

---

**DAFTAR TABEL**


---

<b>Nomor</b>	<b>Nama Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1	Hasil Analisis Tongkol Jagung (Septiningrum dan Apriana, 2011)	8
2.2	Data waktu optimum aktivitas enzim xilanolitik, aktivitas optimum enzim xilanolitik, pertumbuhan optimum E. coli rekombinan campuran pada media MTM, MTM-X1:3, MTM-X1:1, MTM-X	53

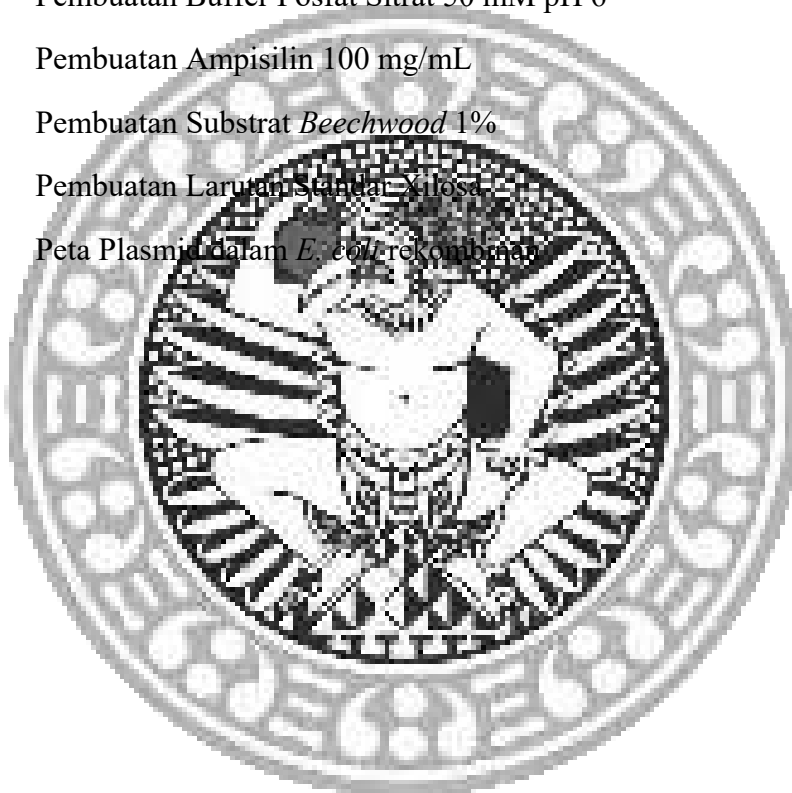


---

**DAFTAR LAMPIRAN**


---

<b>Nomor</b>	<b>Nama Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1	Isolasi Xilan dari Tongkol Jagung	62
2	Pembuatan Media Produksi	63
3	Pertumbuhan <i>E. coli</i> rekombinan campuran	64
4	Uji Aktivitas Enzim Xilanolitik	65
5	Pembuatan Reagen Asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS)	66
6	Pembuatan Buffer Fosfat Sitrat 50 mM pH 6	66
7	Pembuatan Ampisilin 100 mg/mL	67
8	Pembuatan Substrat <i>Beechwood</i> 1%	67
9	Pembuatan Larutan Standar Xilosa	67
10	Peta Plasmid dalam <i>E. coli</i> rekombinan	68



## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Pencemaran lingkungan oleh limbah organik atau yang sering kita sebut sebagai limbah biomassa semakin banyak ditemui di Indonesia. Limbah biomassa tersebut berasal dari bagian hasil pertanian yang tidak dibutuhkan untuk kebutuhan pangan. Hal ini disebabkan oleh permintaan atas kebutuhan pangan masyarakat semakin meningkat seiring dengan bertambahnya populasi penduduk di Indonesia, sedangkan inovasi pemanfaatan limbah biomassa hasil pertanian tersebut masih sangat kurang.

Sejauh ini pemanfaatan limbah biomassa dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan pakan ternak ruminansia, karena mengandung serat kasar dan protein yang dibutuhkan oleh hewan ternak tersebut. Terdapat dua jenis limbah pertanian, yaitu limbah yang langsung dapat digunakan setelah hasil pertaniannya dipanen untuk kebutuhan pakan, yang termasuk jenis limbah ini di antaranya adalah jerami padi, tongkol jagung, jerami ubi jalar, jerami ubi kayu dan jerami berbagai macam tanaman legume dan kacang-kacangan. Limbah lainnya yaitu dari hasil pertanian yang diperoleh setelah melalui proses pengolahan limbah pabrik seperti limbah pengolahan minyak, tahu, tempe, kecap, kopi, gula, coklat dan buah-buahan lainnya (Marlina dan Askar, 2004).

Tongkol jagung merupakan salah satu limbah hasil pertanian yang paling melimpah di Indonesia. Namun untuk pemanfaatannya termasuk yang

paling kecil dibandingkan limbah yang lain. Tongkol jagung kualitasnya lebih rendah dari tongkol lainnya, terutama kandungan proteinnya (Marlina dan Askar, 2004). Sehingga untuk dijadikan sebagai bahan utama pakan ternak ruminansia tidak efisien.

Tongkol jagung mengandung serat kasar lignoselulosa yang tersusun atas lignin, hemiselulosa dan selulosa, dan masing-masing merupakan senyawa yang potensial dapat dikonversi menjadi senyawa lain secara biologi. Limbah biomassa berlignoselulosa dapat mengalami biokonversi menggunakan enzim lignoselulase yang merupakan kumpulan enzim-enzim selulitik, hemiselulitik dan lignolitik. Enzim hemiselulase dapat menghasilkan berbagai monosakarida dan oligosakarida yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut. Enzim hemiselulitik yang paling banyak didisporasi adalah enzim xilanolitik yang dapat mendegradasi xilan menjadi monomer penyusunnya.

Xilanase merupakan golongan enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik dari xilan menjadi monomer-monomer gula penyusunnya. Kompleks enzim xilanolitik meliputi endo- $\beta$ -1,4-xilanase,  $\beta$ -xilosidase dan beberapa enzim lain, seperti  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glukuronidase, asetil xilan esterase, asam ferulat esterase, dan asam *p*-coumaric esterase (Saha, 2003). Masing-masing enzim tersebut memiliki peran spesifik dalam degradasi xilan. Enzim xilanase mampu mendegradasi limbah berlignoselulosa khususnya hemiselulosa menjadi produk yang bermanfaat seperti prebiotik, bioetanol, pakan ternak, dan xilitol serta produk fermentasi lainnya yang banyak digunakan oleh industri (Wong, *et al.*, 1988).



Enzim xilanolitik termofilik yang berasal dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dari kawah panas gunung pancar Bogor, Jawa Barat, Indonesia telah dikarakterisasi oleh Tan (1999). Gen penyandi enzim xilanolitik termofilik dari bakteri tersebut telah berhasil diklon ke plasmid pTP510 dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  dan mengindikasikan adanya lima gen, yang terdiri atas transposase, ABC Permease, *GbtXyl43A* (gen  $\beta$ -D-xylosidase, *xyl43A*), arabinofuranosidase (*abfa51*), dan *GbtXyl43B* (gen  $\beta$ -D-xylosidase, *xyl43B*) (Puspaningsih, 2004; Ratnadewi, 2013).

*GbtXyl43B* merupakan gen penyandi enzim  $\beta$ -xilositase.  $\beta$ -xilositase merupakan salah satu enzim yang terpenting dari kelompok enzim xilanolitik yang menghidrolisis xilooligosakrida dan xilobiosa dari ujung non pereduksi dengan membebaskan xilosa.  $\beta$ -xilositase telah diekspresikan oleh beberapa bakteri yaitu, *Selenomonas rumicantium* (Jordan *et al.*, 2007), *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (Shao *et al.*, 2011), *Aspergillus ochraceus* (Michelin *et al.*, 2012) dan bakteri termofil *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Cao, 2012).

Enzim  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase merupakan enzim dari kelompok xilanolitik yang memiliki peran dalam hidrolisis rantai samping xilan dengan menghasilkan gula arabinosa. Enzim  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase bersinergi dengan enzim xilanolitik lainnya untuk medegradasi secara sempurna substrat xilan. Keberadaan L-arabinosa dalam stuktur xilan dapat mempengaruhi kinerja enzim xilanolitik lainnya. Stuktur L-arabinosa yang cukup besar, dapat menjadi penghalang bagi endo-xilanase dan xilositase untuk menghidrolisis xilan

(Saha, 2000; Debeche, *et al.*, 2000). Oleh karena itu, pencampuran kultur *E.coli* rekombinan yang membawa *GbtXyl43B* dan *abfa51* dilakukan agar dapat meningkatkan sinergitas kerja dari kedua enzim untuk mendegradasi xilan, dengan  $\beta$ -xilosidase memotong xilan dari ujung-ujung non pereduksi dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase memotong struktur L-arabinosa pada bagian tengah xilan.

Parameter penting yang perlu diperhatikan selama proses kultivasi antara lain media kultur, pH, temperatur, kadar oksigen, dan waktu inkubasi. Media kultur merupakan parameter paling penting dalam proses kultivasi. Media kultur terdefinisi adalah suatu media pertumbuhan mikroorganisme yang terdiri atas zat-zat kimia dengan konsentrasi yang telah ditentukan untuk menunjang nutrisi dari bakteri yang dikultur. Zat-zat kimia yang berperan dalam media kultur terdefinisi antara lain sumber karbon, sumber nitrogen, sumber fosfor, dan unsur-unsur pendukung lainnya.

Tim peneliti dari Laboratorium Proteomik Universitas Airlangga, Surabaya, telah melakukan penelitian bahwa media terdefinisi modifikasi yang mengandung sumber karbon, sumber nitrogen, garam anorganik berupa garam fosfat dan garam sulfat, dan dengan modifikasi berupa ekstrak tauge (*bean sprout*) sebagai pelarut dapat memproduksi dan meningkatkan aktivitas enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (Puspaningsih, 2011), sehingga media terdefinisi modifikasi seperti diatas dapat digunakan sebagai media kultur *E.coli* rekombinan yang baik.

Isolasi senyawa hemiselulosa dari tongkol jagung pernah dilakukan oleh Purwani (2014) menggunakan metode ekstraksi dalam suasana basa yang telah dioptimasi oleh Ayu (2006). Hasil yang diperoleh dari ekstraksi ini adalah hemiselulosa berupa xilan A dan xilan B. Xilan A merupakan produk utama yang diperoleh dari pengendapan akibat penambahan asam, sedangkan xilan B merupakan produk sisa yang diperoleh dari pengendapan sisa ekstraksi xilan A dengan alkohol. Xilan yang didapatkan berbentuk serbuk dengan warna coklat muda sampai coklat tua. Serbuk xilan A berwarna lebih tua daripada serbuk xilan B (Purwani, 2014).

Ekstrak xilan merupakan senyawa polisakarida yang tersusun atas rantai karbon yang kompleks, sehingga diharapkan dapat menjadi sumber karbon pada media terdefinisi modifikasi untuk pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran. Selain itu, ekstrak xilan tersebut juga diharapkan dapat berfungsi sebagai induser dalam produksi enzim xilanolitik oleh *E. coli* rekombinan campuran agar dapat meningkatkan jumlah enzim xilanolitik yang dihasilkan. Maka dengan demikian limbah tongkol jagung yang melimpah di Indonesia ini dapat dikonversi menjadi produk yang lebih bermanfaat.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah profil kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran [*GbtXyl43B*] dan [*abfa51*] dalam media ekstrak xilan dari limbah tongkol jagung?
2. Bagaimanakah profil aktivitas enzim xilanolitik campuran dari *GbtXyl43B* dan *abfa51* dalam media ekstrak xilan dari limbah tongkol jagung?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan profil kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran [*GbtXyl*43B] dan [*abfa*51] dalam media ekstrak xilan dari limbah tongkol jagung.
2. Menentukan profil aktivitas enzim xilanolitik campuran dari *GbtXyl*43B dan *abfa*51 dalam media ekstrak xilan dari limbah tongkol jagung.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat kepada para petani jagung di seluruh Indonesia karena limbah tongkol jagung yang tidak digunakan lagi memiliki nilai ekonomis yang lebih tinggi. Pemanfaatan limbah tongkol jagung menjadi media kultur bakteri dan produksi enzim ini merupakan upaya untuk mengurangi pencemaran lingkungan secara signifikan. Penelitian ini pada akhirnya diharapkan dapat menciptakan modifikasi media kultur dan produksi enzim baru yang ramah lingkungan untuk masa depan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Biomassa

Biomassa adalah bahan-bahan organik yang berumur relatif lebih muda dan berasal dari tumbuhan/hewan, produk dan limbah industri budidaya (pertanian, kehutanan, peternakan, perikanan), seperti serat kapuk, tongkol jagung, tongkol jagung, tandan kosong sawit, dan bagas (Soerawidjaja, 2005). Bahan-bahan organik ini merupakan sumber karbon dan energi yang besar dan dapat dimanfaatkan untuk kehidupan manusia. Komponen-komponen karbon dan energi yang terkandung dalam biomassa dalam jumlah besar adalah minyak, protein, gula, pati, dan lignoselulosa sebagai komponen terbesar (Brown, 2003).

Tanaman tak berkayu dan tanaman berkayu merupakan jenis tanaman yang mengandung lignoselulosa (Soerawidjaja, 2005), sehingga untuk mempelajari lignoselulosa biasanya digunakan sel kayu. Secara umum ada dua jenis kayu, yaitu kayu lunak dan kayu keras (Sjostrom, 1998). Lignoselulosa tersusun dari mikrofibril-mikrofibril selulosa yang membentuk kluster-kluster, dengan ruang antar mikrofibril terisi dengan hemiselulosa, dan kluster-kluster tersebut terbebat kuat menjadi satu kesatuan oleh lignin (Soerawidjaja. and Z.I.E. Amiruddin, 2007). Jadi secara kimia, lignoselulosa terdiri atas tiga komponen utama, yaitu lignin, hemiselulosa, selulosa, dan sedikit kandungan ekstraktif.

#### 2.2 Limbah Tongkol Jagung

Kebutuhan jagung saat ini mengalami peningkatan. Dapat dilihat dari segi produksi dimana permintaan pasar domestik ataupun internasional yang

sangat besar untuk kebutuhan pangan dan pakan. Di Indonesia, jumlah kebutuhan jagung meningkat dari tahun ke tahun dalam jumlah yang cukup tinggi karena adanya permintaan dari industri pakan ternak (Departemen Pertanian, 2007). Oleh sebab itu, Pemerintah berusaha keras untuk meningkatkan produksinya melalui perluasan penanaman tanaman jagung antara lain melalui program Gema Palagung dengan target dalam kurun waktu 2005 – 2015 akan terjadi tambahan areal panen seluas 456.810 ha (Suryana, 2006).

Tongkol jagung/janggel adalah limbah yang diperoleh ketika biji jagung dirontokkan dari buahnya. Akan diperoleh jagung pipilan sebagai produk utamanya dan sisa buah yang disebut tongkol atau janggel (Rohaeni et al., 2006).

**Tabel 2.1. Hasil Analisis Tongkol Jagung (Septiningsih dan Apriana, 2011)**

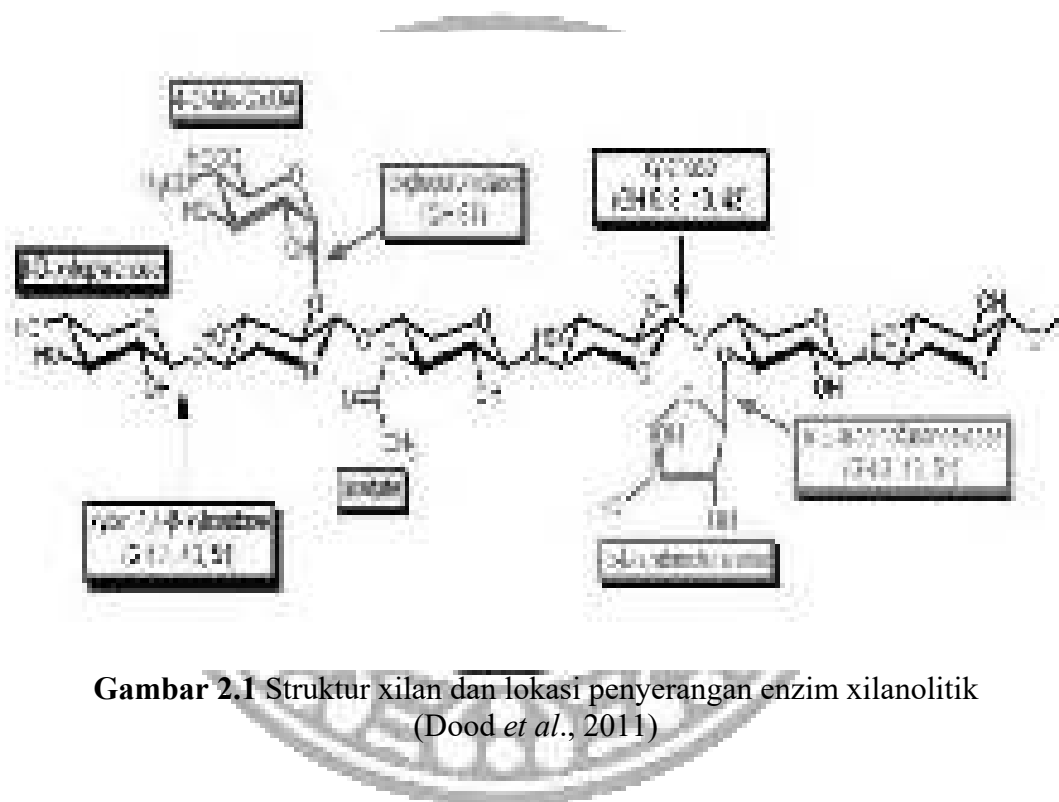
Komponen Kimia	Kandungan (% bdb)
Hemiselulosa	36.92
Alfa-selulosa	26.81
Lignin	15.52
Total Karbon	39.80
Total Nitrogen	2.12
Kadar Air	8.38

Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa kandungan tertinggi tongkol jagung adalah hemiselulosa, sehingga dapat digunakan sebagai media produksi xilanase.

### 2.3 Xilan

Penyusun utama hemiselulosa pada dinding sel tanaman adalah xilan. Xilan yang terdapat pada berbagai jenis tanaman merupakan heteropolisakarida

dengan rantai tulang punggung  $\beta$ -D-xilopiranosida yang terikat oleh ikatan 1,4. Selain xilosa, xilan juga tersusun atas arabinosa, asam glukuronat, dan asam, p-kumarat. Di alam, degradasi sempurna polimer xilan dilakukan oleh beberapa enzim yang disebut enzim xilanolitik. Enzim xilanolitik terdiri dari  $\alpha$ -glukuronidase, asetilxilan esterase, endo-1,4- $\beta$ -xilanase,  $\beta$ -xilosidase, dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (Kumar *et al*, 2008).



**Gambar 2.1** Struktur xilan dan lokasi penyerangan enzim xilanolitik  
(Dood *et al.*, 2011)

## 2.4 Enzim Xilanase

Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim memegang peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel (Richana, 2002).

### 2.4.1 Klasifikasi Enzim Xilanase

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa dalam hal ini ialah xilan atau polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu  $\beta$ -xilosidase dan endoxilanase.  $\beta$ -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai xilo-oligosakarida (Reilly, 1991; Dekker, 1983). Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim  $\beta$ -xilosidase. Sebagian besar enzim  $\beta$ -xilosidase yang berhasil dimurnikan masih menunjukkan adanya aktivitas transferase yang menyebabkan enzim ini kurang dapat digunakan di industri penghasil xilosa (Richana, 2002).

Enzim  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase merupakan enzim xilanolitik yang dapat menghidrolisis rantai samping xilan dengan menghasilkan gula arabinosa. Enzim  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase dapat bersinergi dengan enzim xilanolitik lainnya untuk mendegradasi substrat xilan dengan sempurna. Keberadaan L-arabinosa dalam struktur xilan dapat menjadi penghalang bagi endoxilanase dan  $\beta$ -xilosidase untuk menghidrolisis xilan (Saha, 2000; Debeche, et al., 2000)

Endoxilanase mampu memutus ikatan  $\beta$ -1,4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi, dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut. Xilanase umumnya merupakan protein kecil dengan berat molekul antara 15.000-30.000 Dalton, aktif pada suhu 55°C



dengan pH 9 (Yang et al., 1988; Yu et al., 1991). Pada suhu 60°C dan pH normal, xilanase lebih stabil (Tsuji et al., 1992; Cho-Goo et al., 1996).

#### 2.4.2 Aplikasi Xilanase Dalam Biokonversi Limbah Pertanian

Perkembangan dan kemajuan bidang pertanian dan industri pertanian di Indonesia telah menimbulkan peningkatan limbah pertanian yang sebagian besar merupakan limbah berlignoselulosa. Limbah berlignoselulosa yang tinggi potensinya di Indonesia antara lain tongkol, onggok (ampas tapioka, garut), bonggol dan kulit jagung, sabut serta tandan kosong kelapa sawit, bagase tebu, dan lain sebagainya. Seringkali limbah yang tidak tertangani, akan menimbulkan pencemaran lingkungan. Pada dasarnya limbah ini memiliki nilai ekonomi, bahkan mungkin bernilai negatif karena memerlukan biaya penanganan. Namun demikian, bila ditelaah lebih dalam limbah lignoselulosa sebagai bahan organik memiliki potensi besar sebagai bahan baku berbagai industri, terutama untuk pembuatan kertas. Di samping itu, fiksasi limbah ini menjadi komponen penyusunnya akan meningkatkan pendaaygunaan dalam berbagai industri. Melihat potensi bahan limbah berlignoselulosa yang melimpah maka perlu penggalan lebih intensif tentang pemanfaatan potensi tersebut (Richana, 2002).

Bahan berlignoselulosa terdiri atas hemiselulosa, selulosa, dan lignin. Hemiselulosa dapat dimanfaatkan menjadi produk xylitol, xylosa, dan fulfural. Selulosa dapat dimanfaatkan menjadi protein sel tunggal, glukosa, fruktosa, dan sorbitol. Sedangkan lignin untuk bahan bakar, pelarut, resin, produk karbon, dan matriks adsorpsi (Paturau, 1969).

Pemanfaatan limbah berlignoselulosa dengan menggunakan jasa mikroorganisme dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yang mampu mendegradasi bahan berlignoselulosa menjadi fraksi penyusunnya. Misalkan enzim selulase yang dapat merombak bahan berlignoselulosa berupa tongkol atau sampah organik menjadi kompos, atau menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Sedangkan xilanase dapat menghidrolisis hemiselulosa menjadi xilosa, proses ini dapat diaplikasikan ke beberapa proses dan pemanfaatannya (Richana, 2002).

## 2.5 Media Kultur

Media adalah suatu substansi yang terdiri dari campuran zat-zat makanan atau nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroorganisme. Media dapat berbentuk padat, cair dan semi padat. Di dalam laboratorium mikrobiologi, kultur media sangat penting untuk isolasi, pengujian sifat-sifat fisik dan biokimia bakteri, serta untuk diagnosa suatu penyakit (Sutarma, 2000). Zat makanan yang dibutuhkan bakteri pada umumnya sangat bervariasi, dapat berbentuk senyawa-senyawa organik sederhana atau senyawa-senyawa organik kompleks. Untuk menumbuhkan bakteri pada tanah cukup dengan menggunakan senyawa organik sederhana, tetapi bakteri patogen membutuhkan media yang mengandung ekstrak daging bagi pertumbuhan dan pengembangbiakannya. Selain mengandung zat makanan, media harus mengandung NaCl untuk menaikkan tekanan osmosis media. Tekanan ini sangat penting bagi keseimbangan fisikokhemis suatu sel bakteri yang tumbuh dalam media tersebut (Sutarma, 2000).

### 2.5.1 Komponen Media Kultur

Secara umum media harus mengandung sumber karbon, nitrogen, sulfur, fosfat, vitamin atau bahan-bahan yang dapat mendorong pertumbuhan bakteri seperti ekstrak daging atau ragi. Dari macam-macam media yang sudah dibuat, baik yang diramu maupun bentuk siap pakai untuk keperluan isolasi, identifikasi dan pemeliharaan bakteri diperlukan bahan-bahan nutrisi sebagai berikut (Sutarma, 2000) :

- a. **Energi** untuk keperluan pertumbuhan bakteri pada media yang diperoleh dari oksidasi senyawa organik yang terkandung dalam media tersebut seperti karbohidrat dan protein.
- b. **Sumber karbon** bisa diperoleh dari senyawa organik protein dan karbohidrat. Protein diperoleh misalnya dari ekstrak daging atau pepton, sedangkan karbohidrat diperoleh misalnya dari glukosa, laktosa, sukrosa, dan selulosa.
- c. **Sumber nitrogen dan sulfur**, untuk kebutuhan nutrisi ini ada 2 yaitu : nitrogen dan sulfur anorganik dan nitrogen dan sulfur organik. Kebutuhan nitrogen dan sulfur anorganik biasanya menggunakan amonium sulfat, sedangkan nitrogen dan sulfur organik diperoleh dari protein/pepton atau asam-asam amino.
- d. **Fosfat**, dipakai biasanya dalam bentuk garam seperti kalium dihidrogen fosfat, dikalium hidrogen fosfat, natrium dihidrogen fosfat dan dinatrium hidrogen fosfat.
- e. **Logam-logam Anorganik**, beberapa spesies bakteri ada yang memerlukan unsur logam tertentu, unsur-unsur anorganik diperlukan dan berguna untuk

mengaktivasi enzim, dengan tujuan reaksi biokimiawi dalam sel berjalan lancar. Unsur logam ini pemakaiannya sedikit sekali dan merupakan elemen mikro. Unsur-unsur logam itu diperoleh dari senyawa garamnya, yaitu kalsium dari kalsium klorida, mangan dari mangan klorida, tembaga dari tembaga sulfat hidrat, dan sebagainya.

- f. Pelarut**, pelarut air mutlak diperlukan selain sebagai pelarut bebas media, umumnya bakteri senang atau lebih subur tumbuhnya dengan kandungan air, dan biasanya digunakan akuades.

### 2.5.2 Jenis Media Kultur

Lebih dari 200 macam media tersedia dan dikenal untuk pembiakan, pemeliharaan, dan identifikasi bakteri. Namun demikian tidak semua media dapat mendorong pertumbuhan bakteri. Ada bakteri tertentu yang memerlukan media spesifik/khusus untuk pertumbuhannya. Menurut jenis dan kegunaannya media kultur dapat dikelompokkan sebagai berikut: media terdefinisi, media kompleks, media selektif, dan media diferensial (Madigan dan Martinko, 2006).

#### **a. Media Terdefinisi (*Defined Medium*)**

Media kultur ini dibuat dengan menambahkan secara tepat sejumlah senyawa organik maupun anorganik yang memiliki tingkat kemurnian yang tinggi kedalam akuades. Sehingga, komposisi kimia yang terkandung dalam media terdefinisi ini dapat diketahui. Parameter yang paling penting dalam media kultur adalah sumber karbon, karena sebuah sel membutuhkan jumlah karbon yang banyak untuk membuat sel baru (Madigan dan Martinko, 2006).

**b. Media Kompleks (*Complex Medium*)**

Media kultur ini merupakan kebalikan dari media terdefinisi. Media kultur kompleks biasanya dibuat dengan menambahkan hasil pencernaan hewan maupun produk dari tumbuhan, seperti kasein (protein dalam susu), daging, kacang-kacangan, sel *yeast* (ragi), dan bahan-bahan lain yang memiliki tingkat nutrisi tinggi. Bahan-bahan tersebut mudah didapatkan secara komersil, namun kekurangannya adalah tidak dapat mengetahui komposisi nutrisi yang terkandung (Madigan dan Martinko, 2006).

**c. Media Selektif (*Selective Medium*)**

Media kultur ini dibuat dengan menambahkan sejumlah senyawa kimia yang selektif untuk menghambat pertumbuhan suatu mikroorganisme (Madigan dan Martinko, 2006).

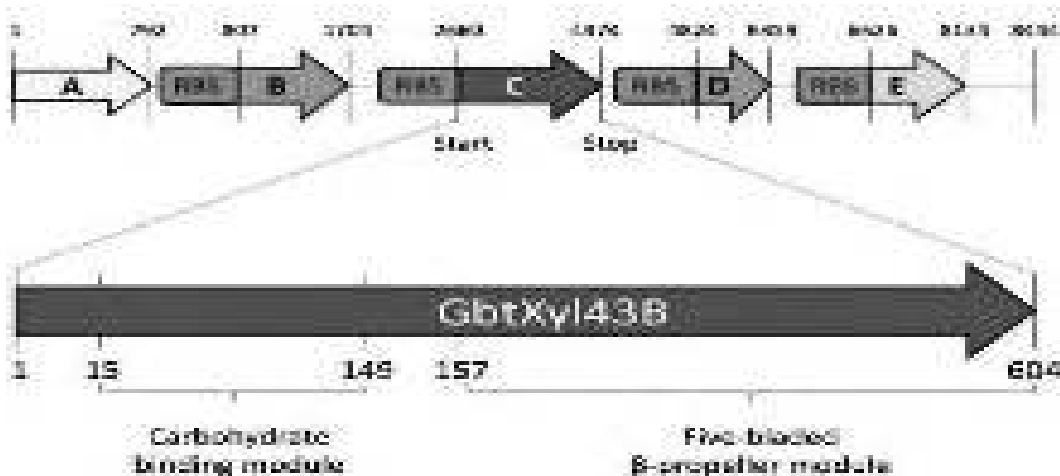
**d. Media Differensial (*Differential Medium*)**

Berkebalikan dengan media selektif, media differensial dibuat dengan menambahkan sejumlah senyawa kimia yang selektif untuk menunjang pertumbuhan suatu mikroorganisme. Media ini sangat berguna untuk membedakan beberapa spesies dari bakteri (Madigan dan Martinko, 2006).

**2.6 *GbtXyl43B***

*GbtXyl43B* adalah gen penyandi enzim  $\beta$ -xilosidase yang berasal dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. *GbtXyl43B* merupakan bagian gen klaster yang berfungsi mengkode enzim xilanolitik dalam pTP510. Analisa yang dilakukan dengan metode bioinformatika yang disajikan pada gambar 2.1 menunjukkan bahwa *GbtXyl43B* merupakan gen yang termasuk ke dalam famili

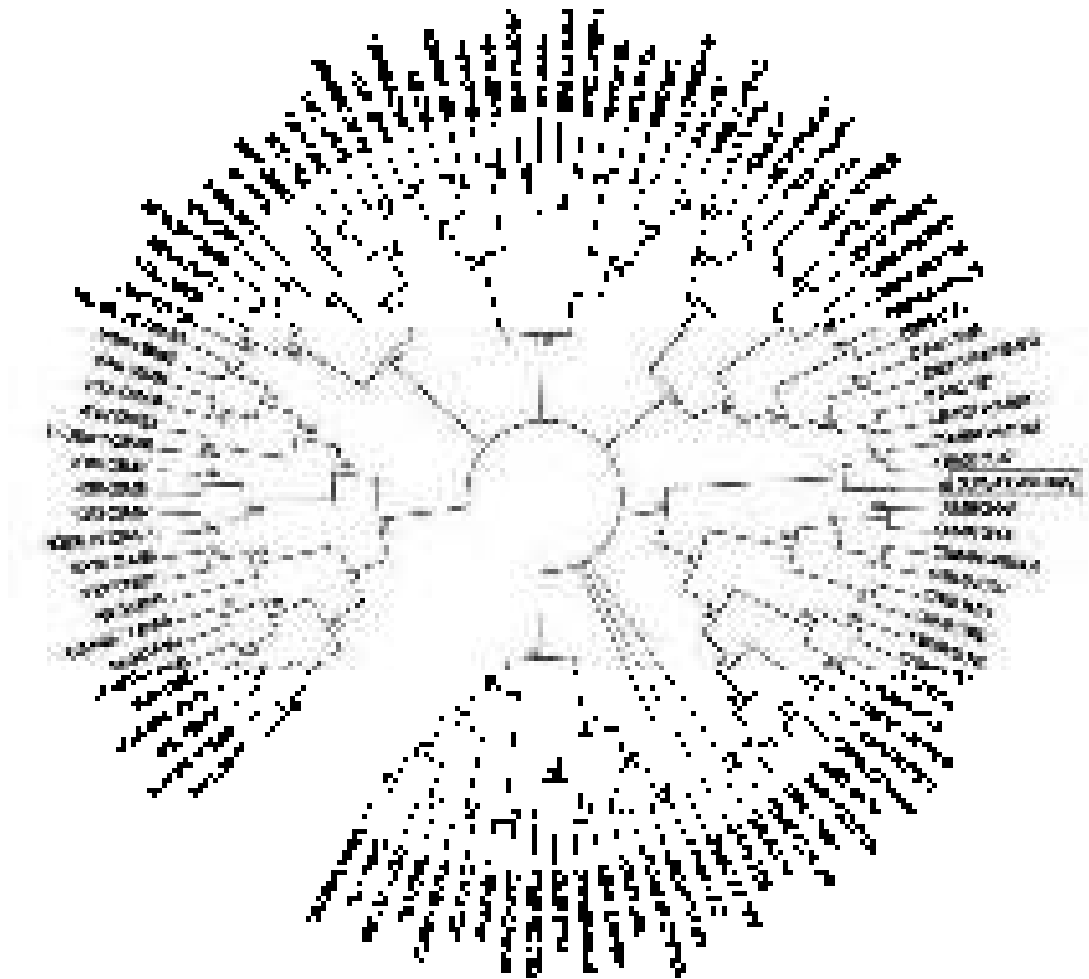
GH43. Famili GH43 meliputi dua modul, yaitu CBM yang berupa  $\beta$ -sandwich dan CM yang berupa five-bladed- $\beta$ -propeller. Prediksi CBM dilakukan dengan mensejajarkan residu asam amino pada urutan ke 15 sampai dengan 149 dari *GbtXyl43B* dengan urutan asam amino dari 103 CBMs yang bersumber dari database CAZy.



**Gambar 2.2** Topologi dari *GbtXyl43B* di kluster xilanase gen. A, B, C, D, dan E menunjukkan gen : plasmid transposase, diaga ABC permease,  $\beta$ -D-xilosidase (*xyl43B*, GenBank No. DQ387047),  $\beta$ -D-xilosidase (*xyl43A*, GenBank No. DQ345777), dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (*abfa51* GenBank No. DQ387046) masing-masing, RBS mengacu pada situs pengikatan ribosom (Puspaningsih, 2004; Ratnadewi, 2013).

Gambar 2.3 menunjukkan bahwa famili CBM terklasifikasi menjadi 6 subfamili (I, CBM3, 4, 20, 21, 27, 30, 33, 34 dan 62; II, CBM1, 2, 35, 40, 59 dan 60; III, CBM9, 16, 29, 31, 42, 43, 63 dan 66; IV, CBM10, 11, 12, 13, 18, 37, 49 dan 51; V, CBM5, 6, 26, 36, 39, 46, 47, 48 dan 65; dan VI, CBM14, 15, 17, 19, 22, 44, 57 dan 61) dengan CBM25 dan CBM32 masih belum terklasifikasi dalam subfamili. *GbtXyl43B* memiliki CBM yang mirip dengan famili CBM36. CBM memiliki kemampuan untuk dapat mengikat substrat tidak larut, terletak pada

urutan residu asam amino 15-149 dan CM yang merupakan daerah katalitik  $\beta$ -xilosidase terletak pada urutan residu asam amino 157-604 (Puspaningsih, 2004; Ratnadewi, 2013).



**Gambar 2.3** Analisis filogenetik CBM dari GbtXyl43B dan kaitannya dengan urutan asam amino dari famili CBM (Puspaningsih, 2004; Ratnadewi, 2013)

## 2.7 Enzim $\alpha$ -L-arabinofuranosidase

Enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase menghidrolisis rantai terminal dan samping dari arabinofuranosida dalam arabinan (ikatan -1,5-arabinofuranosida), juga arabinosil dalam arabinogalaktan dan arabinosil (Taylor et al., 2006;

Wirajana et al., 2010). Penelitian tentang  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ini diperlukan karena berperan penting sebagai enzim kunci pendegradasi xilan dalam hemiselulosa. Enzim ini bersama enzim xilanolitik yang lain semakin menarik diteliti dalam tahun belakangan ini karena aplikasinya dalam konversi berbagai substrat hemiselulosa menjadi monomernya yang dapat difermentasi lebih lanjut menjadi produk yang bermanfaat, seperti etanol, xilitol, 2,3butanediol, dan produk-produk fermentasi lainnya (Saha, 2000; Wirajana, 2010). Enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase juga digunakan dalam produksi arabinosa sebagai antiglycemic agent; produksi senyawa anti-metastatik dan antikarsinogenik; peningkatan kualitas roti, aroma anggur (wine), fermentasi jus buah, dan pakan ternak; biobleaching dari pulp dan kertas untuk mengurangi penggunaan senyawa kimia klorin; dan sintesis oligosakarida (Numan & Ghosle, 2006; Wirajana, 2010).

Gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase termotabil telah diisolasi dari berbagai mikroba termofilik dan diklon sebagian besar di sel inang *Escherichia coli*. Gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dari *Geobacillus caldoxylyolyticus* TK4 (*AbfATK4*) telah diklon di *E. coli* dan enzimnya aktif pada rentang pH 5 – 10 dan suhu 40–85°C. Enzim ini bekerja optimum pada pH 6,0 dan temperatur 75-80°C (Canakci et al., 2007; Wirajana, 2010). Gen *AbfAC26Sari* penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dari *Anoxybacillus kestanbolensis AC26Sari*, telah diklon di *E. coli*. Karakteristik enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase rekombinan yang diproduksi di *E. coli* BL21 menunjukkan optimum pada pH 5,5 dan suhu 65°C (Canakci et al., 2008; Wirajana, 2010).



Gen  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 termofilik telah berhasil diklon ke plasmid pTP510 dalam *E. coli* DH5 $\alpha$ . Enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ekstraseluler dari *G. thermoleovorans* IT-08 maupun yang terekspresi intraseluler di *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTP510 rekombinan menunjukkan kesamaan sifat, yang memiliki aktivitas optimum pada temperatur 70<sup>0</sup>C dan stabilitas pH pada kisaran 5-8. Namun perbedaannya pada pH optimum, enzim yang dihasilkan dari *G. thermoleovorans* IT-08 memiliki pH optimum 7, sedangkan yang diproduksi dari *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTP510 mempunyai pH optimum 6. Gen penyandi  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ini juga telah berhasil diklon dan diekspresi tinggi dalam sistem pET101/D-TOPO di *E. coli*. Dalam sistem ekspresi ini  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase juga terekspresi intraseluler dan memiliki karakteristik yang sama seperti yang terekspresi di *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTP510 (Puspaningsih et al., 2005; Wirajana, 2010).

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Proteomik Lembaga Penyakit Tropis (LPT) dan Laboratorium Kimia Organik-Biokimia Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya dan dimulai pada bulan Januari 2016.

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.2.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat *E. coli* rekombinan camparan [*GbtXy/4-3B*] dan [*abfa51*], yaitu *E. coli* rekombinan yang membawa gen penyandi enzim  $\beta$ -xylosidase dan *E. coli* rekombinan yang membawa gen penyandi enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Isolat merupakan koleksi Laboratorium Proteomik Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga, Surabaya.

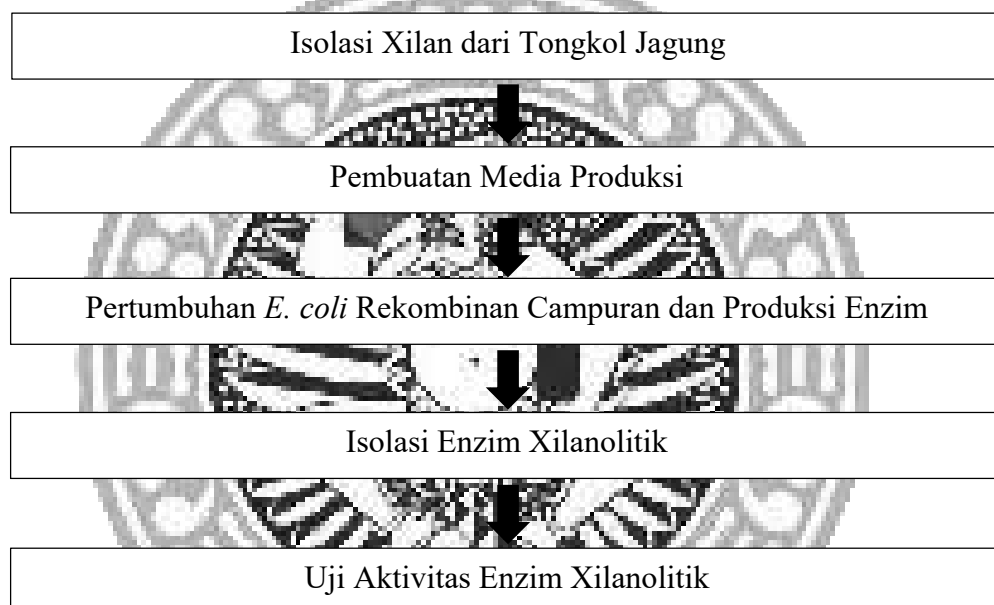
##### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain tongkol jagung dari limbah pertanian jagung di kawasan kelurahan Kademangan, Kota Probolinggo, Jawa Timur, asam asetat 4 N, larutan NaOH 4 N, NaCl 0,9%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ekstrak taoge, ampisilin, buffer fosfat sitrat, reagen DNS, xilosa, penangas air panas, dan penangas es.

### 3.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain saringan 40 mesh, seperangkat alat ekstraksi, corong Buchner, *Sentrifuge*, *Freeze Dryer*, *Sonicator*, Erlenmeyer 500 mL, *Autoclave*, *Thermoshaker*, Spektrofotometer UV-Vis, dan peralatan-peralatan lain untuk media reaksi dan penyimpanan bahan.

### 3.3 Diagram Alir Penelitian



### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Isolasi Xilan dari Tongkol Jagung

Isolasi xilan dari tongkol jagung dilakukan berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Purwani (2014). Tongkol jagung dipotong kecil-kecil lalu dijemur di bawah sinar matahari hingga kering, kemudian digiling menjadi serbuk dengan menggunakan saringan 40 mesh. Sebanyak 5 gram serbuk tongkol jagung ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat leher dua yang sudah berisi 100 mL larutan NaOH 4 N dan pengaduk magnetik. Kemudian diekstraksi selama

2 jam. Ekstrak didinginkan dan disaring dengan corong Buchner. Filtrat diasamkan dengan asam asetat 4 N hingga mencapai pH 5,5-6,0 untuk mengendapkan xilan A, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan endapannya. Endapan tersebut dikeringkan dengan *Freeze Dryer* untuk mendapatkan xilan A yang bebas pelarut.

### 3.4.2 Pembuatan Media Produksi

Pada penelitian ini media produksi yang digunakan adalah media produksi terdefinisi modifikasi yang telah dioptimasi oleh Puspaningsih dkk (2010) dengan komposisi sebagai berikut: glukosa dengan kadar 1,5%, ammonium sulfat dengan kadar 0,1%, magnesium sulfat dengan kadar 0,2%, natrium hidrogen fosfat hidrat dengan kadar 0,67%, kalium dihidrogen fosfat dengan kadar 0,16%, dan ekstrak taoge sebagai pelarut.

Media kontrol disiapkan dengan membuat media terdefinisi modifikasi (MTM) yang sesuai dengan komposisi diatas. Media kontrol lainnya disiapkan dengan memodifikasi media MTM dengan mengganti glukosa dengan xilan dan mengganti pelarut ekstrak taoge dengan pelarut akuades (MTM-X). Variasi media produksi disiapkan sebagai berikut: variasi pertama adalah perbandingan kadar xilan dengan kadar glukosa murni 1 : 3 dalam media MTM (MTM-X1:3). Variasi kedua adalah perbandingan kadar xilan dengan kadar glukosa murni 1 : 1 dalam media MTM (MTM-X1:1). Media produksi dibuat dengan volume 100 mL. Media produksi disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah suam-suam kuku selanjutnya ditambahkan ampisilin 100 µL (100 mg/mL).

### 3.4.3 Pertumbuhan *E. coli* Rekombinan Campuran dan Produksi Enzim

Satu ose biakan *E. coli* rekombinan campuran diambil dari media padat dan diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer 500 mL yang terisi 100 mL media terdefinisi modifikasi yang telah ditambahkan 100  $\mu$ L ampisilin (100 mg/mL). Diinkubasi dalam *Thermoshaker* dengan kecepatan 150 rpm selama  $\pm$ 18 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 1 mL sampel untuk setiap waktu sampling disentrifugasi, pelet dilarutkan dengan NaCl 0,9% dan diukur dengan metode OD<sub>600</sub>. Sampling dilakukan selama 16 jam.

### 3.4.4 Isolasi Enzim Xilanolitik

Sebanyak 10 mL sampel untuk setiap waktu sampling dalam setiap optimasi kadar xilan disentrifugasi dengan kecepatan 5.800 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C. Pelet sel dapat disimpan pada suhu -20°C atau langsung dilisis dengan sonikator. Pelet sel dilarutkan dalam buffer fosfat sitrat yang memiliki pH 6 dan dilisis menggunakan ultrasonikator selama 1 x 4 menit. Enzim diperoleh dalam supernatan hasil sentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

### 3.4.5 Uji Aktivitas Enzim Xilanolitik

Aktivitas enzim xilanolitik ( $\beta$ -xylosidase dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase) ditentukan dengan kemampuan hidrolisis enzim xilanolitik terhadap substrat xilan *beechwood* menjadi gula pereduksi xilosa. Sebanyak 100  $\mu$ L substrat tersebut ditambah 100  $\mu$ L enzim diinkubasi pada temperatur 60°C selama 30 menit. Hasil inkubasi ditambah dengan 600  $\mu$ L DNS, masukkan dalam penangas air panas

selama 15 menit, kemudian segera didinginkan dalam penangas es selama 20 menit. Pengukuran dilakukan dengan alat spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm. Kontrol yang digunakan 100  $\mu$ L enzim non aktif dan diperlakukan sama dengan kondisi di atas tanpa inkubasi (Puspaningsih, 2004).

Standar xilosa dibuat dengan berbagai variasi konsentrasi dari stok xilosa. Sebanyak 200  $\mu$ L larutan standar ditambah dengan 600  $\mu$ L pereaksi DNS. Campuran dimasukkan ke dalam penangas air panas dan dipanaskan selama 15 menit. Kemudian segera didinginkan dalam penangas es selama 20 menit. Pengukuran dilakukan dengan alat spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 550 nm. Larutan blanko digunakan untuk mengganti xilosa dengan akuades (Puspaningsih, 2004). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang melepaskan 1  $\mu$ mol gula pereduksi dalam 1 mL larutan enzim per menit pada kondisi percobaan.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Isolasi Xilan dari Tongkol Jagung

Bahan dasar tongkol jagung diperoleh dari limbah pertanian jagung di kawasan kelurahan Kademangan, Kota Probolinggo, Jawa Timur. Kandungan kimia utama terbesar dalam limbah tongkol jagung adalah komponen lignoselulosa. Hemiselulosa merupakan komponen lignoselulosa yang tertinggi dalam limbah tongkol jagung, yaitu sebesar 31% dan lebih tinggi jika dibandingkan dengan komponen lignoselulosa lain, yaitu selulosa 27% dan lignin 15,5% (Septiningrum dan Apriana, 2011).

Tongkol jagung hasil limbah pertanian ini kemudian digiling secara merata untuk menghasilkan serbuk tongkol jagung. Ukuran yang optimal agar serbuk tongkol jagung dapat diekstraksi dengan baik adalah serbuk dengan ukuran 40 mesh. Tujuan tongkol jagung dibuat menjadi serbuk adalah untuk memperluas permukaan sampel agar proses ekstraksi menjadi lebih efektif dan efisien. Serbuk tongkol jagung tidak boleh digiling terlalu halus, karena akan menyebabkan sampel menjadi sangat rapat, sehingga pelarut tidak dapat menjangkau seluruh permukaan sampel yang akan diekstraksi.

Serbuk tongkol jagung diekstraksi menggunakan pelarut NaOH 4N yang bersifat basa. Ekstrak xilan larut sempurna dalam alkali, larut dalam air panas dan sedikit larut pada air dingin, dan tidak larut dalam asam (Richana et al., 2007).

Oleh karena itu, tujuan menggunakan pelarut NaOH 4N adalah untuk melarutkan ekstrak xilan dalam serbuk tongkol jagung. Metode alkali lebih efektif merusak ikatan ester antara lignin, hemiselulosa dan selulosa dan mencegah fragmentasi polimer hemiselulosa (Siregar dkk, 2014). Sehingga tidak hanya ekstrak xilan yang terlarut dalam pelarut alkali, selulosa juga memiliki kelarutan yang tinggi dalam pelarut alkali setelah ikatan ester tersebut putus. Lignin tidak dapat terlarut dalam pelarut alkali, karena NaOH 4N dapat mendegradasi lignin yang akan mengakibatkan struktur lignin lisis, kemudian mengakibatkan sebagian molekulnya terkondensasi dan mengendap (Fengel dan Wegener, 1995).

Proses ekstraksi dilakukan dengan kondisi yang telah dioptimasi oleh Ayu (2006), yaitu dengan refluks pada suhu  $90^{\circ}\text{C}$  selama 120 menit. Hasil dari refluks adalah berupa cairan kental berwarna coklat kebiruan. Cairan tersebut kemudian dipisahkan dari endapannya dengan cara melakukan penyaringan dengan alat corong Buchner. Tujuan menggunakan corong Buchner adalah untuk memisahkan filtrat dan endapannya dengan sempurna. Endapan yang tersaring adalah berupa ampas dari serbuk tongkol jagung dan molekul-molekul lain yang terkandung didalamnya yang tidak dapat larut dalam pelarut alkali seperti lignin, sehingga harus dipisahkan dan dibuang.

Filtrat yang telah bebas endapan tersebut diasamkan dengan asam asetat 4N. Sesuai pernyataan yang dikemukakan oleh Richana et al. (2007) bahwa ekstrak xilan tidak dapat larut dalam pelarut asam. Oleh karena itu, tujuan penambahan asam asetat 4N dalam filtrat bebas endapan tersebut adalah untuk mengendapkan ekstrak xilan yang sebelumnya terlarut dalam pelarut alkali, dan membiarkan



selulosa yang sebelumnya juga ikut terlarut dalam pelarut alkali tetap terlarut, karena selulosa hanya akan mengendap jika ditambahkan pelarut asam kuat seperti HCl. Selulosa adalah makromolekul dengan kristalinitas yang sangat kuat, sehingga hanya asam kuat yang dapat menghidrolisis selulosa (Siregar dkk, 2014).

Ekstrak xilan terendapkan sempurna dalam pelarut asam asetat 4N dengan rentang pH antara 5,5 – 6,0. Endapan dipisahkan dari pelarut asam dengan proses sentrifugasi. Tujuan memisahkan endapan dengan pelarut asam menggunakan proses sentrifugasi adalah untuk memisahkan endapan dengan pelarutnya secara sempurna dan mengendapkan endapan larut kembali dalam pelarut asam, karena ekstrak xilan yang terbentuk belum padat dan tidak stabil. Dengan sentrifugasi maka endapan yang dihasilkan menjadi lebih rapat dan padat sehingga ekstrak xilan menjadi lebih stabil dan tidak dapat larut kembali dalam pelarut asam.

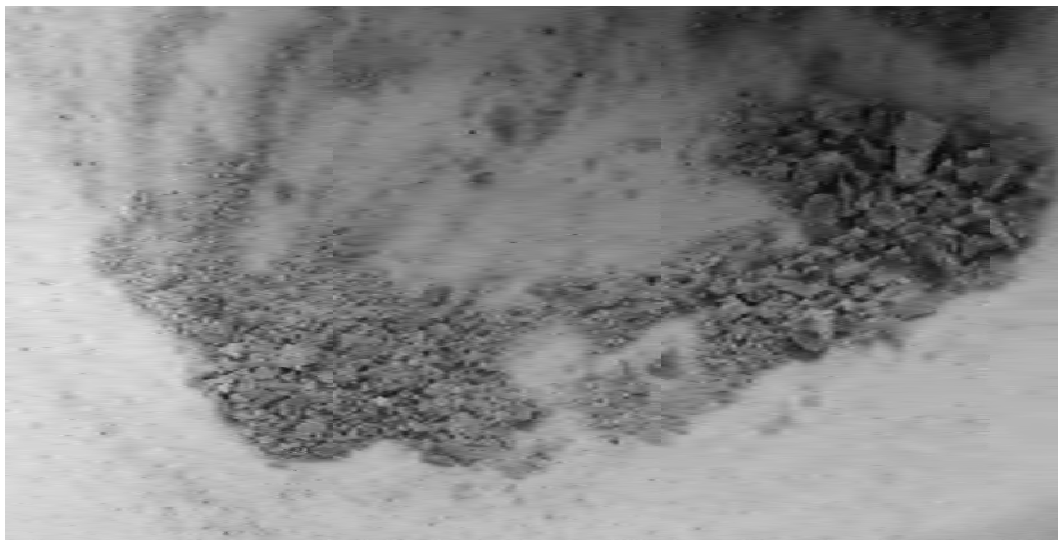
Sentrifugasi dilakukan dengan berbagai volume filtrat dan kecepatan rotasi, hal ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hasil endapan maksimum yang dihasilkan, yaitu volume filtrat 2 mL dengan kecepatan 7500 rpm, volume filtrat 12 mL dengan kecepatan 3500 rpm, dan volume filtrat 45 mL dengan kecepatan 3500 rpm. Hasil optimum dicapai ketika sentrifugasi dilakukan dengan volume 2 mL dengan kecepatan 7500 rpm, hal ini dikarenakan kecepatan rotasinya paling tinggi dibandingkan dengan yang lainnya, sehingga ekstrak xilan akan mengendap lebih maksimal, meskipun membutuhkan waktu yang lebih lama.

Endapan ekstrak xilan yang dihasilkan dari sentrifugasi ini dipisahkan dengan cara dekantasi, yaitu dengan menuangkan filtrat secara perlahan hingga

benar-benar terpisah dari ekstrak xilannya. Ekstrak xilan tersebut masih bercampur dengan sisa-sisa pelarut asam sehingga ekstrak xilan masih basah dan belum bisa digunakan sebagai komponen media produksi enzim xilanolitik oleh *E.coli* rekombinan campuran. Oleh karena itu, ekstrak xilan tersebut perlu diproses lebih lanjut yaitu dibebaskan dari sisa-sisa pelarutnya dengan alat *Freeze Dryer*. Prinsip kerja dari *Freeze Dryer* adalah dengan membekukan terlebih dahulu sampel ekstrak xilan yang masih mengandung sisa pelarut, kemudian sampel beku tersebut mengalami proses sublimasi, yaitu proses absorpsi panas yang dilakukan oleh *collector* dan pompa vakum yang ada pada *chamber* bawah (*freezon*) dengan tujuan untuk menguapkan es yang membekukan sampel.

Hasil dari proses *freeze drying* tersebut adalah ekstrak xilan kering dari tongkol jagung yang telah bebas dari sisa-sisa pelarut asam sebelumnya, sehingga ekstrak xilan tersebut telah siap digunakan sebagai komponen media produksi enzim xilanolitik oleh *E.coli* rekombinan campuran. Hasil isolasi ekstrak xilan dari tongkol jagung adalah berupa serbuk kasar berwarna kuning kecoklatan. Namun ada beberapa ekstrak xilan yang menggumpal setelah proses *freeze drying*, hal ini disebabkan oleh kandungan pelarut asam yang masih tinggi dalam endapan, sehingga ekstrak xilan menjadi lengket. Seharusnya sebelum proses *freeze drying* dilakukan alangkah lebih baik jika pelarutnya dihilangkan terlebih dahulu dengan pelarut netral seperti akuades. Ekstrak xilan yang terdapat pada tongkol jagung ada 2 jenis, yaitu ekstrak xilan A dan ekstrak xilan B. Pada penelitian ini ekstrak xilan yang diisolasi adalah ekstrak xilan A, ekstrak xilan B tidak diisolasi. Karena ekstrak xilan B merupakan produk sekunder atau produk sisa dari proses isolasi ini yang

jumlahnya sangat sedikit dibandingkan dengan ekstrak xilan A. Ekstrak xilan A dan ekstrak xilan B merupakan senyawa hemiselulosa yang sama, namun ekstrak xilan B memiliki berat molekul yang lebih kecil daripada ekstrak xilan A, sehingga akan mengendap setelah ekstrak xilan A terendapkan.



**Gambar 4.1** Serbuk ekstrak xilan hasil isolasi dari tongkol jagung setelah *Freeze Drying*

Ekstrak xilan yang dihasilkan dari 331 gram serbuk tongkol jagung adalah sebanyak 4,3 gram. Dengan demikian persentase isolasi ekstrak xilan dari tongkol jagung pada penelitian ini adalah sebesar 12,29% dari berat kering. Dari persentase yang demikian dapat dikatakan bahwa isolasi ekstrak xilan dari tongkol jagung pada penelitian ini kurang maksimal, jika merujuk pada penelitian yang pernah dilakukan oleh Purwani (2014) yang mendapatkan ekstrak xilan sebanyak 68,09% dari total berat kering. Hal ini dapat dikarenakan bahan dasar serbuk tongkol jagung yang digunakan. Pada penelitian ini lebih banyak digunakan serbuk dari kulit tongkol jagung daripada bagian tengahnya yang memiliki kandungan ekstrak xilan lebih banyak, yang disebabkan oleh penggilingan tongkol jagung yang

tidak merata. Penyebab lain adalah tidak terendapkannya ekstrak xilan dengan sempurna selama proses sentrifugasi, sehingga filtrat masih keruh. Hal ini telah diantisipasi dengan melakukan sentrifugasi ulang pada setiap filtrat yang masih keruh, namun hasilnya tidak maksimal dan filtrat masih tetap keruh.

Ekstrak xilan yang diisolasi dari tongkol jagung ini diharapkan dapat menjadi sumber karbon alternatif pengganti glukosa bagi pertumbuhan *E.coli* rekombinan campuran dalam media terdefinisi modifikasi (MTM). Ekstrak xilan merupakan senyawa hemiselulosa yang mengandung banyak atom karbon sehingga dapat menjadi sumber karbon bagi *E.coli* rekombinan campuran. Selain itu, ekstrak xilan tersebut juga diharapkan dapat berfungsi sebagai induser dalam produksi enzim xilanolitik oleh *E.coli* rekombinan campuran, sehingga dapat meningkatkan jumlah enzim xilanolitik yang dihasilkan. Septiningrum dan Apriana (2011) telah berhasil memproduksi enzim xilanolitik dari tongkol jagung menggunakan *Bacillus circulans* dengan metode fermentasi fase padat dengan aktivitas xilanolitik tertinggi yaitu 11,006 U/mL.

#### 4.2 Pertumbuhan *E. coli* Rekombinan Campuran [*GbtXyl43B*] dan [*abfa51*]

Pada penelitian ini bakteri atau isolat yang digunakan adalah *E. coli* rekombinan campuran yaitu *E. coli* rekombinan yang membawa gen penyandi enzim  $\beta$ -xilosidase dan *E. coli* rekombinan yang membawa gen penyandi enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Tujuan pencampuran ini adalah untuk meningkatkan sinergitas kerja fungsional dari kedua enzim. Enzim  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase dapat bersinergi dengan enzim ekstrak xilanolitik lainnya, dalam penelitian ini adalah enzim  $\beta$ -Xilosidase, untuk medegradasi substrat ekstrak xilan secara sempurna.

Enzim  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase merupakan enzim dari kelompok xilanolitik yang memiliki peran dalam hidrolisis rantai samping ekstrak xilan dengan menghasilkan gula arabinosa. Enzim  $\beta$ -Xilosidase merupakan enzim yang memiliki aktivitas eksoxilanse dengan menghidrolisis 1,4- $\beta$ -D-xilooligosakarida mejadi gula xilosa dari ujung nonreduksi xilooligosakarida.

Isolat *E. coli* rekombinan campuran disiapkan dari koleksi yang dimiliki oleh Laboratorium Proteomik Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga, Surabaya. Isolat dibiakkan terlebih dahulu dalam media padat Luria Bertani agar isolat yang digunakan merupakan isolat yang segar karena baru tumbuh, sehingga akan mendapatkan data penelitian yang valid dan optimal. Media padat Luria Bertani dipilih sebagai media tumbuh isolat karena media tersebut bersifat universal, proses pembuatannya sangat mudah dan tidak membutuhkan waktu yang lama, dan telah teruji sebagai media pembiakan isolat yang sangat baik. Penambahan antibiotik ampicilin kedalam media padat Luria Bertani diperlukan dalam pembiakan isolat *E. coli* rekombinan campuran agar isolat dapat tumbuh, karena dalam plasmid *E. coli* rekombinan campuran terdapat gen penyandi resistensi terhadap ampisilin.

Media produksi enzim xilanolitik dari *E. coli* rekombinan campuran disiapkan dengan menggunakan berbagai macam variasi. Media produksi yang dijadikan sebagai kontrol dalam penelitian ini adalah Media Terdefinisi Modifikasi (MTM) yang telah dikembangkan oleh Sanjaya (2016) di Laboratorium Proteomik LPT UNAIR. Media MTM mengandung berbagai komponen sumber nutrisi dengan kadar yang telah ditentukan yang dibutuhkan oleh isolat agar dapat tumbuh.

Komponen-komponen tersebut antara lain glukosa sebagai sumber karbon, ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen, magnesium sulfat sebagai sumber mineral, natrium hidrogen fosfat hidrat sebagai sumber mineral, kalium dihidrogen fosfat sebagai sumber mineral, dan ekstrak taoge sebagai pelarut.

Media MTM menggunakan ekstrak taoge sebagai pelarut bertujuan untuk menambah nutrisi pada media produksi. Nutrisi pokok yang terdapat dalam ekstrak taoge adalah sumber nitrogen dan sumber karbon yang diduga berupa gula pereduksi. Diperlukan 5 gram kecambah taoge dalam 100 mL akuades yang dipanaskan hingga volume air berkurang setengahnya untuk mendapatkan ekstrak taoge. Media kontrol lainnya disiapkan dengan memodifikasi media MTM dengan mengganti pelarut ekstrak taoge dengan pelarut akuades dan mengganti keseluruhan kadar glukosa dengan ekstrak xilan (MTM-X). Media kontrol tersebut dibuat dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh glukosa untuk pertumbuhan isolat dan pengaruh ekstrak xilan sebagai inducer untuk produksi enzim xilanolitik dari *E. coli* rekombinan campuran.

Media alternatif yang dikembangkan pada penelitian ini adalah modifikasi dari media MTM. Modifikasi dilakukan dengan menambahkan ekstrak xilan hasil isolasi dari tongkol jagung sebagai sumber karbon dalam media MTM dengan kadar tertentu untuk mengurangi kadar glukosa yang telah dioptimasi sebelumnya. Penambahan kadar ekstrak xilan dilakukan dengan berbagai variasi perbandingan dengan kadar glukosa. Variasi pertama adalah perbandingan kadar ekstrak xilan dengan kadar glukosa 1 : 3 dalam media MTM (MTM-X1:3). Variasi kedua adalah perbandingan kadar ekstrak xilan dengan kadar glukosa 1 : 1 dalam

media MTM (MTM-X1:1). Berbagai variasi tersebut dipilih dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh kadar penambahan ekstrak xilan yang paling optimal sebagai sumber karbon alternatif untuk pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dan sebagai induser untuk produksi enzim xilanolitik campuran yang mengandung enzim  $\beta$ -xilosidase dan enzim  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

Semua sampel dari setiap variasi media disentrifugasi, supernatan hasil sentrifugasi dipisahkan dari pelet dengan dekantasi, pelet sentrifugasi dilarutkan dengan NaCl 0.9% agar dapat menghilangkan sisa-sisa glukosa yang ikut terambil pada saat sampling (Basaf et al., 2010). Metode pengukuran penentuan kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran pada penelitian ini adalah dengan menggunakan metode OD<sub>600</sub>. Metode OD<sub>600</sub> adalah pengukuran jumlah bakteri atau mikroba menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis yang didasarkan pada kemampuan bakteri menyerap cahaya monokromatis pada panjang gelombang 600 nm. Metode OD<sub>600</sub> juga didasarkan pada tingkat kekeruhan suatu larutan yang diukur, jika semakin tinggi jumlah bakteri maka larutan akan semakin keruh dan nilai absorbansi yang terbaca akan semakin tinggi pula. Nilai absorbansi yang terbaca harus berada diantara rentang 0,2 s/d 0,8, karena rentang nilai tersebut merupakan rentang nilai absorbansi optimal yang dapat dibaca oleh Spektrofotometer UV-Vis. Apabila nilai absorbansi yang terbaca melebihi rentang tersebut maka harus dilakukan pengenceran terlebih dahulu agar pengukuran absorbansinya kembali optimal. Setiap sampel yang telah dilarutkan dengan NaCl 0.9% diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Larutan NaCl 0.9% disiapkan sebagai larutan blanko pada pengukuran ini.

#### 4.2.1 Profil Kurva Pertumbuhan

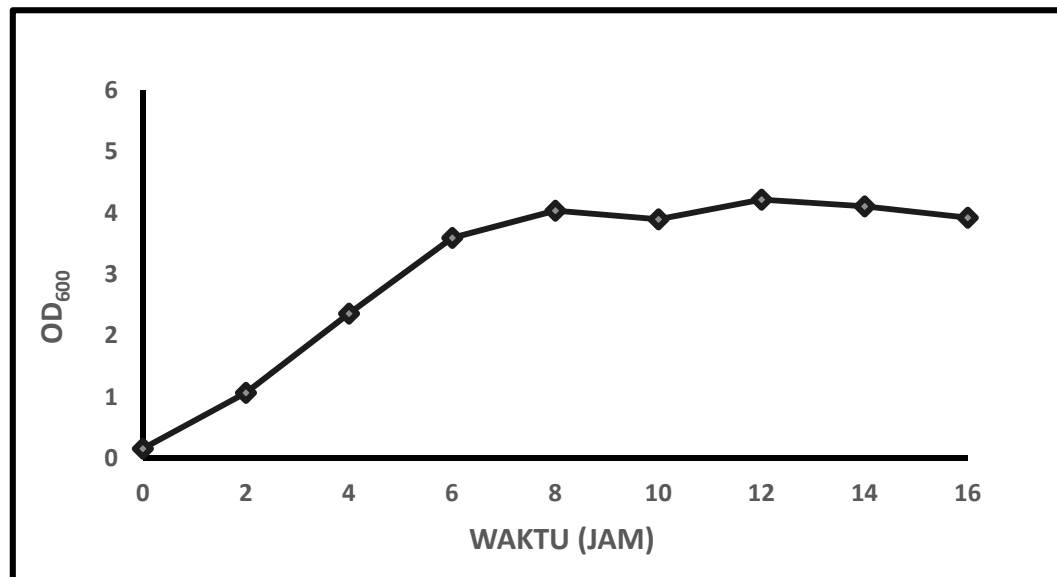
Kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran sebagai isolat diperoleh dengan memasukkan nilai waktu sampling dalam satuan jam sebagai harga sumbu-X dan nilai absorbansi sampel melalui pengukuran OD<sub>600</sub> sebagai sumbu-Y. Kurva pertumbuhan tersebut menunjukkan bagaimana proses pertumbuhan isolat atau fase-fase pertumbuhan yang dialami oleh isolat dalam media produksi yang dimodifikasi dengan berbagai variasi pada penelitian ini. Jika grafik menunjukkan kenaikan nilai OD<sub>600</sub> maka dapat diartikan isolat mengalami pertumbuhan sel atau pertumbuhan isolat memasuki fase eksponensial atau fase logaritmik. Sedangkan jika grafik mengalami penurunan atau stagnasi nilai OD<sub>600</sub> maka dapat diartikan isolat tidak mengalami pertumbuhan sel atau pertumbuhan isolat memasuki fase stasioner. Puncak fase eksponensial pertumbuhan isolat ditentukan dengan titik waktu sampling dengan nilai OD<sub>600</sub> tertinggi sebelum pertumbuhan isolat memasuki fase stasioner.

Sedangkan fase kematian isolat tidak dapat diukur dengan metode OD<sub>600</sub>, karena sel isolat yang mati masih terdapat dalam media produksi, sehingga tetap mempengaruhi tingkat kekeruhan dari sampel yang diukur. Larutan kontrol dibutuhkan untuk penentuan kurva pertumbuhan isolat dalam setiap media produksi, karena di dalam media produksi tersebut terkandung ekstrak xilan yang tidak dapat larut sempurna dalam pelarut akuades maupun ekstrak taoge, sehingga besar kemungkinan ekstrak xilan tidak larut tersebut ikut terambil pada saat sampling. Larutan kontrol disiapkan dari setiap media produksi sebelum



penambahan isolat. Nilai OD<sub>600</sub> larutan kontrol tersebut menjadi faktor pengurang untuk nilai OD<sub>600</sub> sampel.

#### 4.2.1.1 Pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM

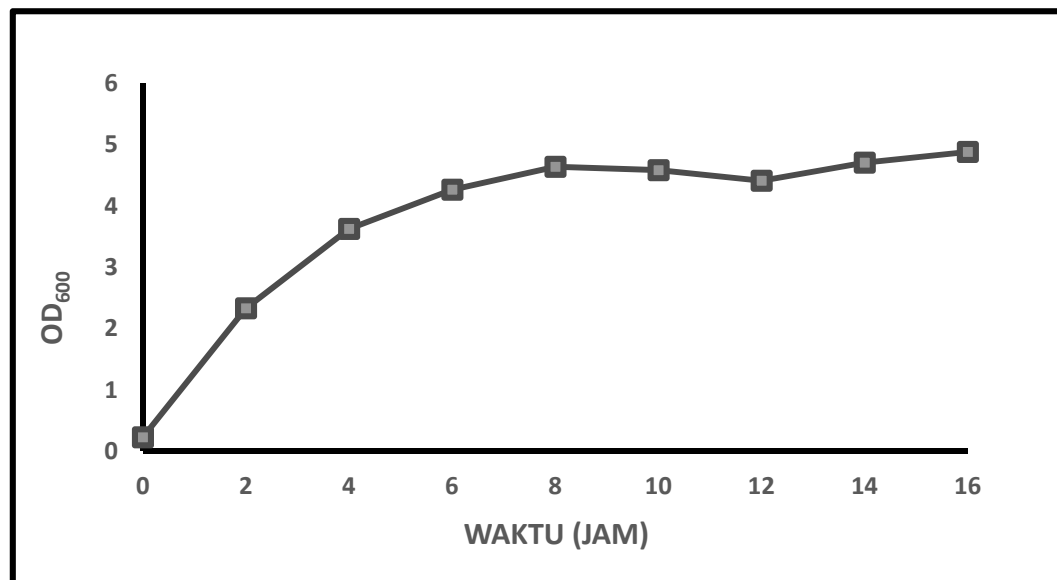


**Gambar 4.2** Kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM

Dari data grafik tersebut, dapat diketahui bahwa isolat belum tumbuh pada sampling jam ke-0. Isolat mulai mengalami pertumbuhan sel pada waktu sampling jam ke-2. Pada waktu sampling jam ke-4 isolat mengalami pertumbuhan sel yang signifikan. Isolat masih mengalami pertumbuhan yang signifikan hingga jam ke-6 waktu sampling. Namun pertumbuhan sel isolat mulai menurun drastis ketika memasuki waktu sampling jam ke-8. Hingga akhirnya pertumbuhan isolat mulai memasuki fase stasioner setelah jam ke-8 sampai dengan waktu sampling jam ke-16. Meskipun pada waktu sampling jam ke-12 nilai OD<sub>600</sub> mengalami kenaikan, namun kenaikan tersebut tidak dapat dikatakan sebagai pertumbuhan sel, karena kenaikan nilai OD<sub>600</sub> pada jam ke-12 tidak sebesar kenaikan nilai OD<sub>600</sub> pada jam ke-2, jam ke-4, maupun jam ke-6, sehingga dinyatakan sebagai fase stasioner.

Puncak fase eksponensial pertumbuhan isolat pada media ini adalah pada waktu sampling jam ke-8, yaitu dengan nilai OD<sub>600</sub> sebesar 4,035.

#### 4.2.1.2 Pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM-X1:3

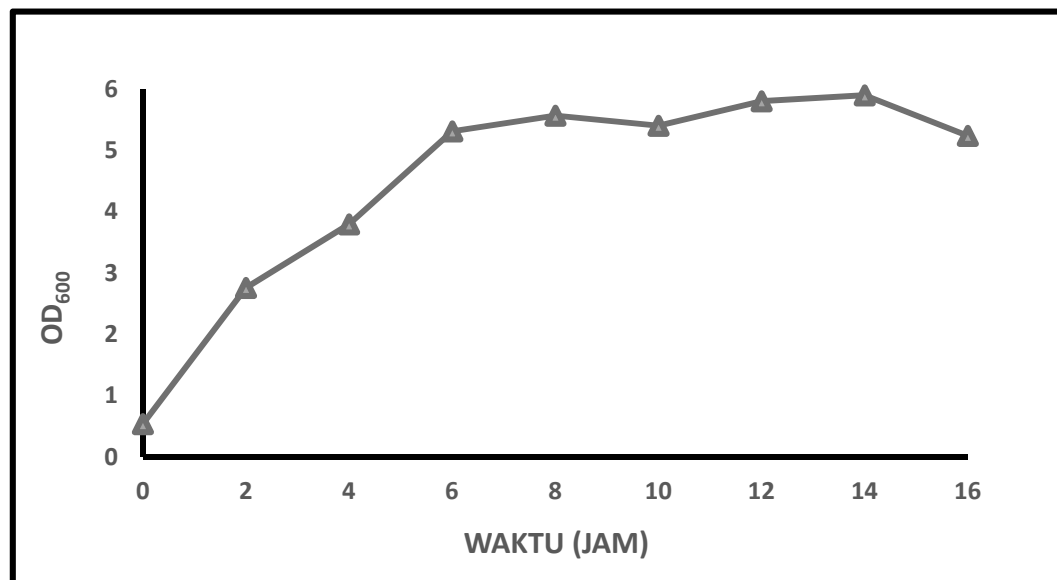


**Gambar 4.3** Kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM-X1:3

Data grafik tersebut menunjukkan bahwa isolat belum tumbuh pada sampling jam ke-0. Isolat mulai mengalami pertumbuhan sel secara signifikan pada waktu sampling jam ke-2. Pada waktu sampling jam ke-4 isolat masih mengalami pertumbuhan sel secara signifikan. Isolat mulai mengalami penurunan pertumbuhan pada jam ke-6. Pertumbuhan sel isolat menurun drastis ketika memasuki waktu sampling jam ke-8. Hingga akhirnya pertumbuhan isolat mulai memasuki fase stasioner setelah jam ke-8 sampai dengan waktu sampling jam ke-16. Meskipun pada waktu sampling jam ke-14 dan jam ke-16 nilai OD<sub>600</sub> mengalami kenaikan, namun kenaikan tersebut tidak dapat dikatakan sebagai pertumbuhan sel, karena kenaikan nilai OD<sub>600</sub> pada jam tersebut tidak sebesar kenaikan nilai OD<sub>600</sub> pada jam ke-2 dan jam ke-4, sehingga dinyatakan sebagai fase

stasioner. Puncak fase eksponensial pertumbuhan isolat pada media ini adalah pada waktu sampling jam ke-8, yaitu dengan nilai  $OD_{600}$  sebesar 4,635.

#### 4.2.1.3 Pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM-X1:1

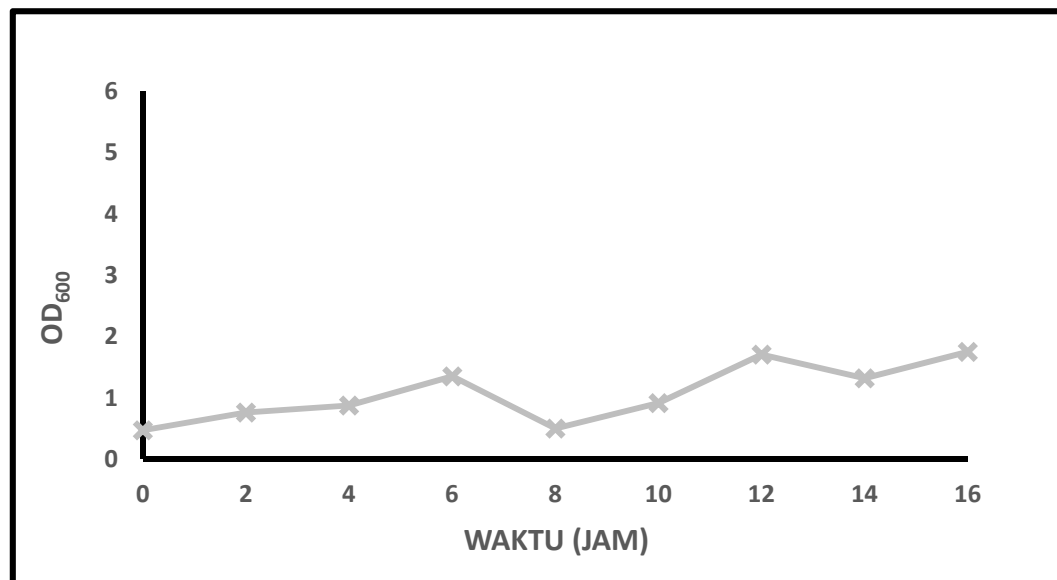


**Gambar 4.4** Kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM-X1:1

Data grafik tersebut menunjukkan bahwa isolat belum tumbuh pada sampling jam ke-0. Isolat mengalami pertumbuhan sel yang signifikan pada waktu sampling jam ke-2. Pada waktu sampling jam ke-4 dan jam ke-6 isolat masih mengalami pertumbuhan sel yang signifikan. Namun pertumbuhan sel isolat mulai menurun dengan sangat drastis ketika memasuki waktu sampling jam ke-8. Hingga akhirnya pertumbuhan isolat mulai memasuki fase stasioner setelah jam ke-8 sampai dengan waktu sampling jam ke-16. Meskipun pada sampling jam ke-12 dan jam ke-14 nilai  $OD_{600}$  mengalami kenaikan, namun kenaikan tersebut tidak dapat dikatakan sebagai pertumbuhan sel, karena kenaikan nilai  $OD_{600}$  pada jam ke-12 dan jam ke-14 tersebut tidak sebesar kenaikan nilai  $OD_{600}$  pada jam ke-2, jam ke-4, maupun jam ke-6, sehingga dinyatakan sebagai fase stasioner. Puncak fase

eksponensial pertumbuhan isolat pada media ini adalah pada waktu sampling jam ke-8, yaitu dengan nilai OD<sub>600</sub> sebesar 5,565.

#### 4.2.1.4 Pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM-X



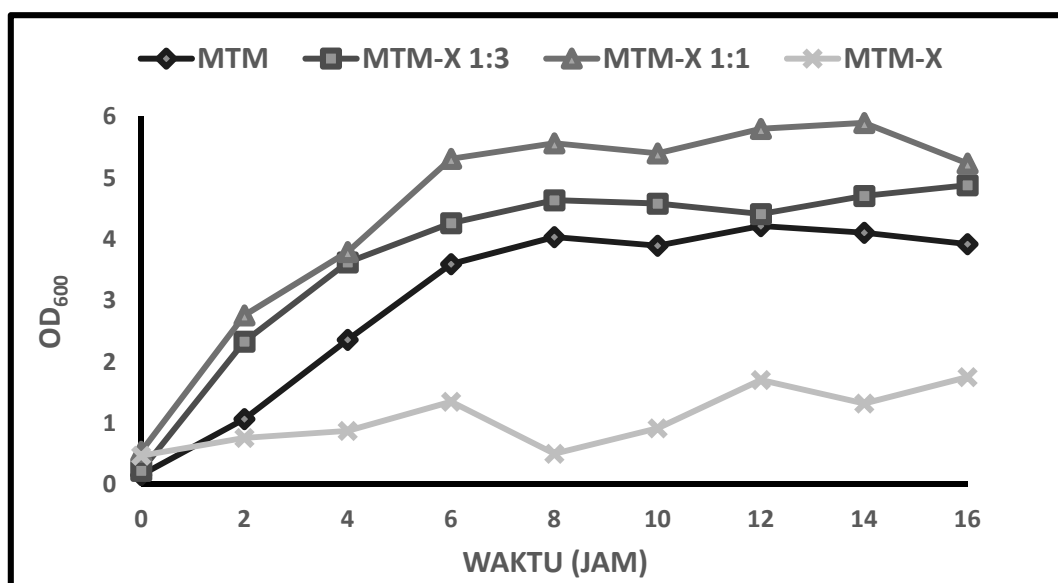
**Gambar 4.5** Kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM-X

Data grafik tersebut dapat menunjukkan bahwa isolat belum tumbuh pada sampling jam ke-0, isolat mulai mengalami pertumbuhan sel pada waktu sampling jam ke-2, namun pertumbuhannya tidak terlalu signifikan. Pada sampling jam ke-4 dan jam ke-6 isolat masih mengalami pertumbuhan sel yang tidak terlalu signifikan. Pertumbuhan isolat terhenti ketika memasuki waktu sampling jam ke-8. Namun, pertumbuhan isolat mulai meningkat lagi ketika memasuki waktu sampling jam ke-10. Hingga waktu sampling jam ke-12 isolat mengalami pertumbuhan sel yang cukup signifikan apabila dibandingkan dengan pertumbuhan isolat pada awal waktu sampling. Ketika memasuki waktu sampling jam ke-14 pertumbuhan isolat kembali terhenti. Namun, pada waktu sampling jam ke-16 pertumbuhan isolat mulai terlihat lagi dengan nilai OD<sub>600</sub> yang hampir sama dengan pertumbuhan isolat

pada jam ke-12. Nilai pertumbuhan isolat tertinggi pada media ini adalah pada waktu sampling jam ke-12, yaitu dengan nilai OD<sub>600</sub> sebesar 1,750.

#### 4.2.2 Perbandingan Profil Kurva Pertumbuhan dari Semua Media

Profil kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam setiap variasi media dapat dilihat pada gambar 4.6 berikut ini:



**Gambar 4.6** Kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM, MTM-X1:3, MTM-X1:1, dan MTM-X

Pengamatan terhadap data grafik diatas dapat diketahui bahwa *E. coli* rekombinan campuran memiliki profil kurva pertumbuhan yang sama pada media MTM, MTM-X1:3, dan MTM-X1:1, sedangkan pada media MTM-X memiliki profil kurva pertumbuhan yang berbeda. Pada media MTM, MTM-X1:3, dan MTM-X1:1 isolat mengalami fase eksponensial hingga pada jam ke-6 selama produksi. Fase eksponensial adalah fase pertumbuhan bakteri dimana bakteri mengalami pertumbuhan sel secara signifikan. Setelah jam ke-6 pertumbuhan isolat mulai menurun dengan drastis, dan akhirnya pertumbuhan isolat mulai mengalami fase stasioner setelah jam ke-8 hingga jam ke-16 selama produksi. Fase stasioner

adalah fase pertumbuhan bakteri dimana bakteri tidak lagi mengalami pertumbuhan sel. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain menipisnya sumber nutrisi pada media produksi, perubahan pH yang terlalu ekstrim, perubahan suhu yang terlalu ekstrim, dsb.

Dengan mengetahui profil kurva pertumbuhan isolat yang sama pada media MTM, MTM-X1:3, dan MTM-X1:1, maka dapat disimpulkan bahwa ketiga media tersebut memiliki karakteristik yang hampir sama. Pertumbuhan isolat tertinggi sebelum mengalami fase stasioner pada media MTM terjadi pada jam ke-8 dengan nilai  $OD_{600}$  sebesar 4,033, dan pertumbuhan isolat tertinggi pada media MTM-X1:3 sebelum mengalami fase stasioner terjadi pada jam ke-8 dengan nilai  $OD_{600}$  sebesar 4,633, sedangkan pertumbuhan isolat tertinggi pada media MTM-X1:1 sebelum mengalami fase stasioner terjadi pada jam ke-8 dengan nilai  $OD_{600}$  sebesar 5,563.

Data tersebut menunjukkan bahwa pertumbuhan isolat tertinggi dari ketiga media terjadi pada jam ke-8, dimana isolat pada media MTM-X1:1 memiliki nilai pertumbuhan tertinggi, isolat pada media MTM-X1:3 memiliki nilai pertumbuhan tertinggi kedua, dan isolat pada media MTM memiliki nilai pertumbuhan tertinggi ketiga. Bahkan dari setiap waktu sampling isolat pada media MTM-X1:1 selalu memiliki nilai pertumbuhan tertinggi, dan isolat pada media MTM-X1:3 selalu memiliki nilai pertumbuhan tertinggi kedua, sedangkan isolat pada media MTM selalu memiliki nilai pertumbuhan tertinggi ketiga.

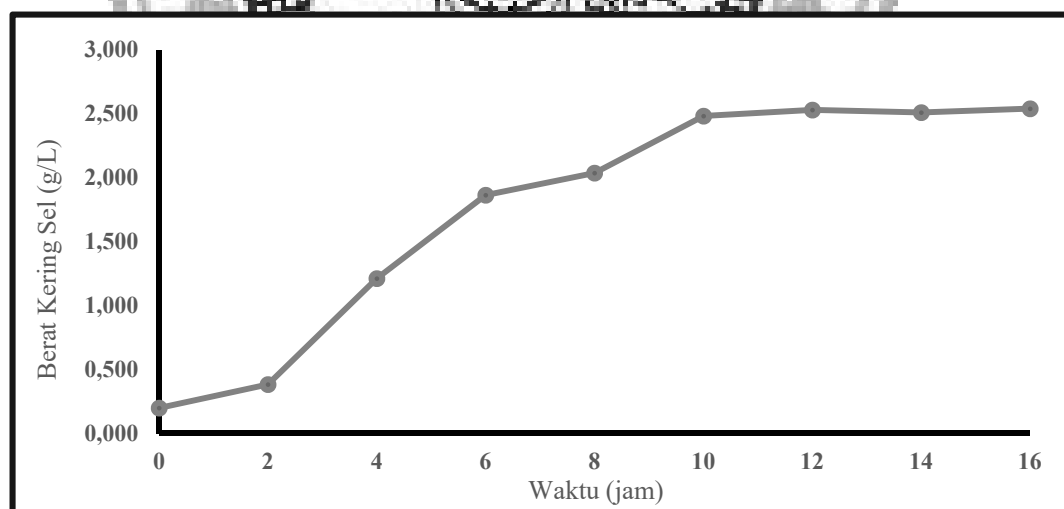
Pertumbuhan isolat *E. coli* rekombinan campuran pada media MTM, MTM-X1:3, dan MTM-X1:1 memiliki profil kurva pertumbuhan atau karakteristik yang sama dikarenakan ketiga media tersebut menggunakan ekstrak taoge sebagai pelarut dengan konsentrasi yang sama. Ekstrak taoge diduga mengandung nutrisi berupa gula pereduksi yang sangat mudah dikonsumsi oleh *E. coli* rekombinan campuran. Jadi gula pereduksi dari ekstrak taoge akan dikonsumsi terlebih dahulu bersamaan dengan glukosa oleh isolat dalam jumlah besar selama fase pertumbuhan eksponensial. Setelah itu media mengalami penipisan kadar glukosa dan gula pereduksi, sehingga pertumbuhan isolat melambat hingga akhirnya pertumbuhan terhenti dan isolat mengalami fase stasioner pada jam ke-8.

Profil kurva pertumbuhan diatas juga dapat menyimpulkan bahwa penambahan ekstrak xilan dengan kadar yang lebih tinggi dapat meningkatkan pertumbuhan isolat. Dengan adanya penambahan ekstrak xilan, maka hal tersebut dapat menurunkan kadar glukosa dalam media. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa penambahan kadar ekstrak xilan dan penurunan kadar glukosa dalam media produksi memiliki pengaruh yang analog terhadap profil kurva pertumbuhan isolat. Media MTM-X1:1 memiliki kandungan kadar ekstrak xilan dan kadar glukosa yang sama, media MTM-X1:3 memiliki kandungan kadar ekstrak xilan lebih rendah daripada kadar glukosa, media MTM tidak memiliki kandungan ekstrak xilan namun memiliki kadar glukosa tertinggi.

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa pertumbuhan isolat terbaik terjadi pada media MTM-X1:1. Laju pertumbuhan isolat pada ketiga media

produksi tersebut dipengaruhi oleh faktor kadar glukosa. Glukosa dibutuhkan dalam pertumbuhan isolat, namun dengan kandungan glukosa yang berlebih dapat menyebabkan laju pertumbuhan isolat menjadi lebih lambat, sebaliknya dengan kandungan glukosa yang lebih sedikit dapat mempercepat laju pertumbuhan isolat. Hal tersebut dikarenakan dalam kondisi aerob glukosa menghasilkan senyawa organik berupa asam asetat, sehingga isolat bersifat liofilik. Asam asetat dapat masuk ke isolat melalui membran permeabel dan terionisasi melepaskan asam dalam sel yang dapat menurunkan pH isolat, akibatnya pertumbuhan isolat terhambat.

Data yang didapatkan dari penelitian yang dilakukan oleh Sanjaya (2016), mengenai pengaruh glukosa terhadap pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran tersaji dalam gambar 4.6 berikut:



**Gambar 4.7** Kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran dalam media MTM yang mengandung 0% glukosa (Sanjaya, 2016)

Berdasarkan data grafik tersebut, *E. coli* rekombinan campuran dapat tumbuh dalam media MTM meskipun di dalam media produksi tersebut tidak mengandung glukosa, karena media MTM menggunakan ekstrak taoge sebagai



pelarut yang diduga mengandung nutrisi berupa gula pereduksi. Sehingga isolat akan menggunakan gula pereduksi dari ekstrak taoge sebagai satu-satunya sumber karbon. Namun, nilai pertumbuhan isolat tertinggi sebelum mencapai fase stasioner adalah terjadi pada pertumbuhan jam ke-8 dengan nilai berat kering sel sebesar 2,482. Jika dibandingkan dengan media MTM yang mengandung glukosa pada penelitian ini, maka terdapat perbedaan nilai pertumbuhan isolat yang signifikan, dimana nilai pertumbuhan isolat tertinggi sebelum mencapai fase stasioner pada media MTM yang mengandung glukosa pada penelitian ini adalah terjadi pada pertumbuhan jam ke-8 dengan nilai OD<sub>600</sub> sebesar 4,035. Data tersebut membuktikan bahwa glukosa merupakan komponen yang penting dalam pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran yang harus ditambahkan dalam media produksi, namun dengan kadar yang optimal agar isolat dapat mengalami pertumbuhan terbaik.

Sedangkan kurva pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran pada media MTM-X memiliki profil yang berbeda jika dibandingkan dengan profil kurva pertumbuhan isolat pada media MTM, MTM-X1:3, dan MTM-X1:1. Hal ini dapat disebabkan oleh ketiadaan glukosa dalam media dan perbedaan pelarut yang digunakan. Ketiga media tersebut mengandung glukosa dan menggunakan pelarut ekstrak taoge diduga mengandung gula pereduksi di dalamnya, sedangkan pada media MTM-X tidak ditambahkan glukosa dan menggunakan akuades sebagai pelarut yang tidak mengandung nutrisi apapun, sehingga ekstrak xilan yang tidak dapat larut sempurna menjadi satu-satunya sumber karbon dalam media ini.

Ekstrak xilan yang terdapat dalam media ini merupakan senyawa polisakarida yang tidak dapat larut sempurna dalam pelarut netral seperti akuades, sehingga ekstrak xilan tersebut akan semakin sulit untuk dikonsumsi oleh isolat. Akibatnya isolat mengalami kesulitan untuk dapat tumbuh dalam media ini. Data grafik menunjukkan bahwa isolat dapat tumbuh di titik-titik awal waktu sampling. Pada titik-titik tersebut isolat dapat tumbuh dengan mengonsumsi nutrisi garam-garam mineral anorganik seperti ammonium sulfat, magnesium sulfat, kalium dihidrogen fosfat, dan natrium hidrogen fosfat. Hingga pada akhirnya garam-garam mineral tersebut mulai habis, sehingga pertumbuhan isolat terhenti.

Data grafik menunjukkan adanya pertumbuhan isolat kembali setelah pertumbuhan isolat sempat terhenti. Hal ini dikarenakan isolat dapat melakukan adaptasi dengan kondisi kekurangan nutrisi di dalam media ini. Adaptasi yang dilakukan oleh isolat agar tetap dapat tumbuh dalam media ini adalah dengan cara memproduksi enzim xilanolitik dalam jumlah yang sangat tinggi. Produksi enzim xilanolitik yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan terakumulasinya enzim xilanolitik tersebut ke dalam rongga periplasmik. Terakumulasinya enzim xilanolitik ke dalam rongga periplasmik dapat menyebabkan terjadinya kenaikan tekanan osmosis, sehingga dapat terjadi proses transport molekul melalui *outer membrane* (Hasenwinkle et al., 1997). Produksi enzim xilanolitik dapat menyebabkan gangguan pada membran (Pugsley et al., 1997), sehingga meningkatkan selektivitas permeabilitas membran (Slos et al., 1994), yang dapat memfasilitasi kebocoran membran. Sekresi di dalam rongga periplasmik juga dapat menyebabkan lisis sel (Lee et al., 2001), yang menyebabkan lepasnya sebagian atau

seluruh konten yang ada di dalam rongga periplasmik. Dalam hal ini, enzim xilanolitik yang terakumulasi di dalam rongga periplasmik akhirnya dapat keluar dari isolat melalui *outer membrane* karena menipisnya permeabilitas membran dan adanya tekanan osmosis. Dengan keluarnya enzim xilanolitik dari isolat, maka terjadilah sekresi protein secara ekstraseluler di dalam media ini. Enzim xilanolitik dapat menghidrolisi ekstrak xilan tidak larut yang ada dalam media menjadi gula yang lebih sederhana, yaitu xilosa. Dengan demikian maka isolat dapat dengan mudah mengonsumsi xilosa sebagai sumber karbon untuk dapat bertahan hidup di dalam media ini, sehingga pertumbuhan isolat kembali berjalan selama xilosa masih tersedia.

Pertumbuhan isolat kembali terhenti pada waktu sampling jam ke-14. Hal tersebut disebabkan karena ketersediaan xilosa dalam media mulai habis. Namun pertumbuhan isolat kembali berjalan setelah jam ke-14 menuju waktu sampling jam ke-16, hal ini dapat disebabkan oleh isolat kembali memproduksi enzim xilanolitik dalam jumlah yang tinggi, maka proses transport enzim xilanolitik dari isolat menuju media melalui *outer membrane* kembali terjadi. Sehingga sekresi ekstraseluler dapat terjadi di dalam media. Enzim xilanolitik dapat menghidrolisis ekstrak xilan tidak larut menjadi xilosa. Xilosa kembali tersedia dan pertumbuhan isolat dapat kembali berjalan. Semua kronologi pertumbuhan isolat yang terjadi dalam media ini mengindikasikan bahwa selama 16 jam waktu sampling isolat mengalami fase adaptasi terhadap kondisi ekstrim yang ada di dalam media. Sehingga perlu waktu sampling yang lebih lama untuk dapat mengetahui profil fase eksponensial dan fase stasioner yang dialami oleh isolat pada media MTM-X.

### 4.3 Aktivitas Enzim Xilanolitik

Sampling untuk uji aktivitas enzim xilanolitik dilakukan bersamaan dengan sampling pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran. Namun, sampling untuk uji aktivitas enzim xilanolitik hanya dilakukan pada waktu sampling jam ke-6, waktu sampling jam ke-10, dan waktu sampling jam ke-12. Waktu sampling tersebut ditentukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sanjaya (2016), dimana pada media MTM produksi enzim xilanolitik tertinggi oleh *E. coli* rekombinan campuran adalah pada waktu sampling jam ke-6, waktu sampling jam ke-10, dan waktu sampling jam ke-12.

Semua sampel disentrifugasi untuk mengendapkan isolat agar dapat dipisahkan dari supernatannya. Pelet sel hasil sentrifugasi dicuci dengan NaCl, yang bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa glukosa maupun gula sederhana yang kemungkinan masih terdapat dalam pelet (Basar et al., 2010). Larutan NaCl yang mengandung pelet disentrifugasi dan pelet sel dipisahkan dari supernatannya, kemudian dilarutkan dalam pelarut buffer fosfat sitrat pH 6 dengan konsentrasi 50  $\mu$ M. Larutan tersebut disonikasi untuk memecah sel agar enzim xilanolitik yang dihasilkan oleh isolat dapat keluar dan terlarut dalam buffer fosfat sitrat. Buffer fosfat sitrat dapat menjaga kestabilan enzim xilanolitik, sehingga enzim xilanolitik tidak mengalami denaturasi. Larutan hasil sonikasi disentrifugasi untuk mengendapkan pecahan sel-sel yang telah rusak.

Supernatan hasil sentrifugasi yang mengandung enzim xilanolitik diinkubasi dalam penangas air pada suhu 50°C. Inkubasi pada suhu 50°C dilakukan untuk menghilangkan protein-protein yang tidak diinginkan yang masih

ikut terlarut dalam supernatan, sehingga protein akan terdenaturasi. Oleh karena itu, setelah diinkubasi pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  harus dilakukan sentrifugasi kembali untuk mengendapkan protein-protein yang terdenaturasi tersebut. Xilan *beechwood* digunakan sebagai substrat pada penelitian ini, yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  dalam penangas air selama  $\pm 10$  menit. Tujuan pemanasan tersebut adalah untuk mempercepat proses hidrolisis substrat oleh enzim xilanolitik. Ekstrak xilan *beechwood* ditambahkan kedalam supernatan hasil sentrifugasi yang mengandung enzim xilanolitik, dan diinkubasi dalam penangas air pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Tujuan dilakukannya inkubasi pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  adalah untuk mengoptimalkan proses hidrolisis substrat *beechwood* oleh enzim xilanolitik, karena enzim xilanolitik dapat menghidrolisis substrat ekstrak xilan secara optimal pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ .

Proses hidrolisis substrat *beechwood* oleh enzim xilanolitik dihentikan dengan cara menambahkan pereaksi DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) ke dalam campuran enzim xilanolitik dan substrat setelah diinkubasi. Pereaksi DNS dapat menghambat kinerja enzim xilanolitik, sehingga enzim xilanolitik menjadi tidak aktif dan tidak dapat menghidrolisis substrat. Campuran enzim xilanolitik, substrat *beechwood*, dan pereaksi DNS dipanaskan dalam penangas air pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  atau air mendidih selama 15 menit, karena pereaksi DNS adalah pereaksi yang bersifat oksidator, apabila ditambahkan ke dalam larutan yang mengandung senyawa pereduksi seperti gula pereduksi xilosa, maka akan terjadi proses reaksi reduksi-oksidasi atau redoks, dan reaksi redoks tersebut dapat terjadi pada suhu tinggi, yaitu suhu air mendidih atau  $100^{\circ}\text{C}$ . Pemanasan dihentikan setelah 15 menit

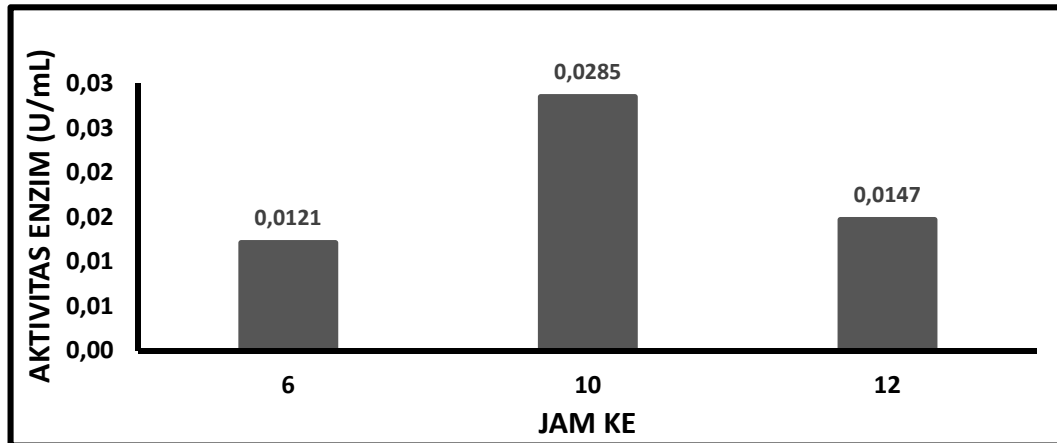
dan campuran tersebut diletakkan ke dalam penangas es selama 20 menit. Tujuan pendinginan tersebut adalah karena reaksi redoks yang terjadi antara pereaksi DNS dan gula pereduksi xilosa akan terhenti akibat penurunan suhu yang sangat ekstrim. Campuran tersebut didiamkan pada suhu kamar untuk mencegah terjadinya pengembunan yang dapat berpengaruh pada pengukuran absorbansi.

#### 4.3.1 Profil Aktivitas Enzim Xilanolitik

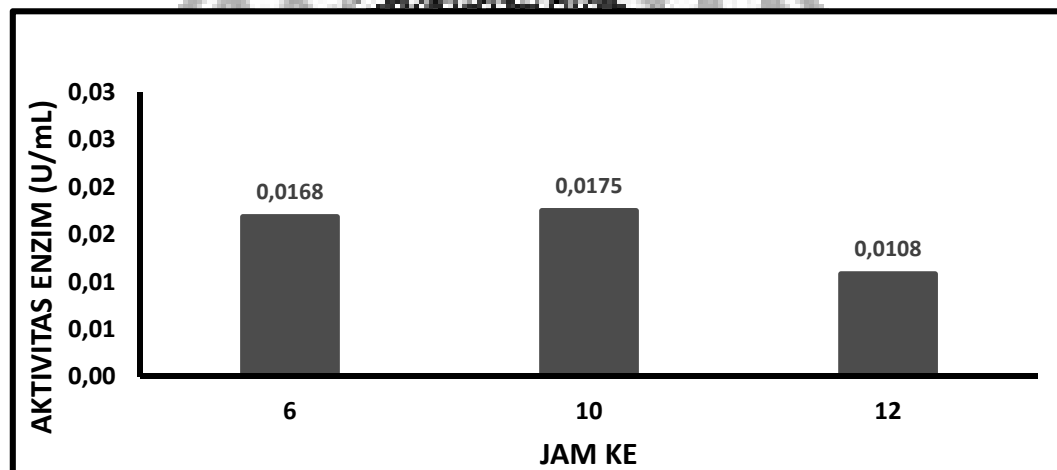
Aktivitas enzim xilanolitik dinyatakan sebagai kemampuan sejumlah enzim xilanolitik yang dapat menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  (U/mL) gula pereduksi xilosa dalam waktu satu menit. Aktivitas enzim xilanolitik ditentukan dengan pengukuran melalui metode pereaksi DNS. Pereaksi DNS adalah senyawa asam 3,5-dinitrosalisilat yang dapat mengoksidasi gula pereduksi menjadi dua senyawa, yang salah satunya adalah senyawa asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang dapat menyerap sinar monokromatis pada panjang gelombang 540-550 nm. Aktivitas enzim xilanolitik ditentukan dengan pengukuran absorbansi menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 550 nm. Konsentrasi xilosa ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva standar xilosa. Aktivitas enzim xilanolitik diukur dengan menggunakan rumus berikut:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{[\text{xilosa}] \times \text{Faktor Pengenceran} \times \text{volume total} \times 1000}{\text{Mr Xilosa} \times \text{waktu inkubasi} \times \text{volume enzim}}$$

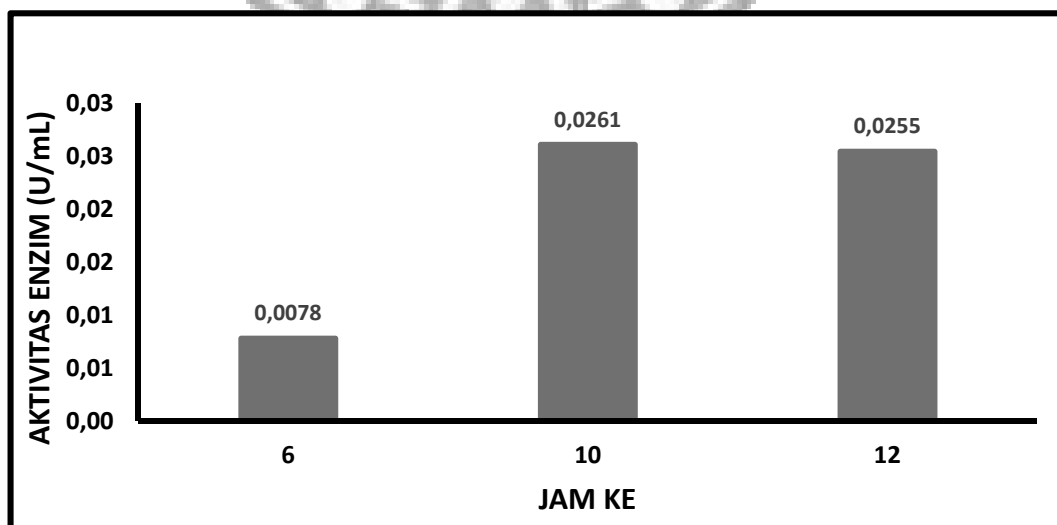
Aktivitas enzim xilanolitik dari setiap variasi media tersaji dalam gambar berikut:



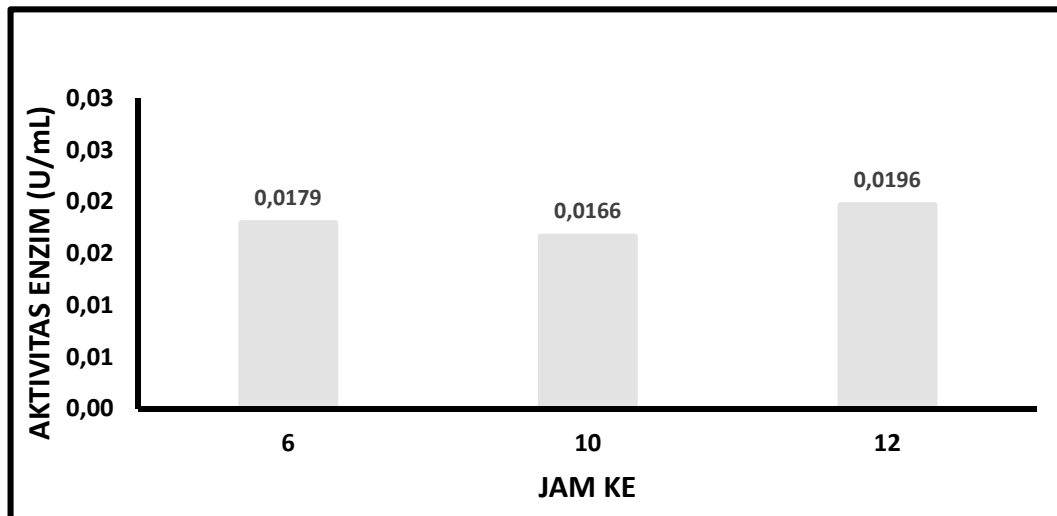
**Gambar 4.8** Aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM



**Gambar 4.9** Aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X1:3



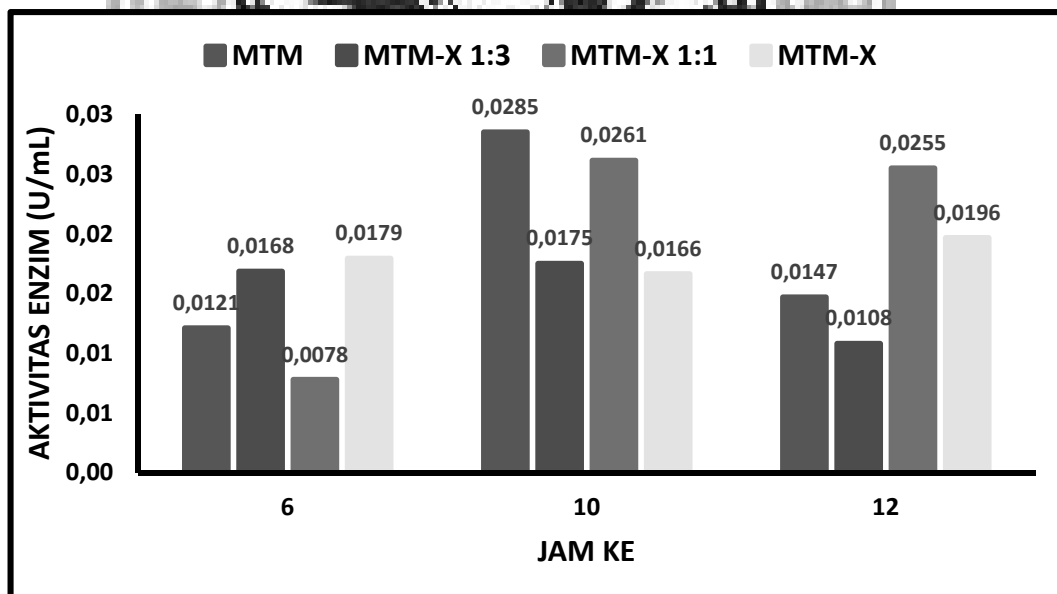
**Gambar 4.10** Aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X1:1



Gambar 4.11 Aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X

#### 4.3.2 Perbandingan Aktivitas Enzim Xilase dari Setiap Variasi Media

Profil aktivitas enzim xilanolitik dalam setiap variasi media dapat dilihat pada gambar 4.12 berikut ini:



Gambar 4.12 Aktivitas enzim xilanolitik pada berbagai variasi media

Dari data grafik tersebut, dapat diketahui bahwa aktivitas enzim xilanolitik pada berbagai variasi media pada penelitian ini dapat dikatakan rendah, karena aktivitas enzim xilanolitik tertinggi yang dihasilkan adalah sebesar



0,0285 U/mL. Pada media MTM, aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dihasilkan pada jam ke-10 dengan nilai aktivitas sebesar 0,0285 U/mL. Pada media MTM-X1:3, aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dihasilkan pada jam ke-10 dengan nilai aktivitas 0,0175 U/mL. Pada media MTM-X1:1, aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dihasilkan pada jam ke-10 dengan nilai aktivitas 0,0261 U/mL. Pada media MTM-X, aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dihasilkan pada jam ke-12 dengan nilai aktivitas 0,0196 U/mL.

Dari data aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dari setiap media tersebut, dapat diketahui bahwa media MTM merupakan media produksi yang paling baik untuk enzim xilanolitik, sedangkan media MTM-X1:3 merupakan media produksi yang paling rendah untuk enzim xilanolitik. Media MTM-X memiliki nilai aktivitas enzim xilanolitik yang hampir mendekati nilai aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM, sehingga media MTM-X merupakan media produksi alternatif yang paling baik untuk memproduksi enzim xilanolitik. Sedangkan media MTM-X merupakan media yang dapat memaksakan isolat untuk memproduksi enzim xilanolitik dalam jumlah yang besar agar dapat bertahan hidup, oleh karena itu nilai aktivitas enzim xilanolitik pada media ini cenderung lebih konsisten daripada media yang lain. Jadi dengan data aktivitas enzim xilanolitik yang didapatkan dapat disimpulkan bahwa media produksi yang mengandung ekstrak xilan dapat dijadikan sebagai media produksi alternatif untuk enzim xilanolitik karena semua media produksi alternatif tersebut dapat menghasilkan enzim xilanolitik dengan baik.

Berdasarkan data penelitian yang diperoleh, dapat diduga bahwa ekstrak xilan tidak berperan sebagai induser untuk produksi enzim xilanolitik dalam

semua media produksi yang mengandung xilan. Keberadaan ekstrak xilan sebagai induser seharusnya dapat menyebabkan terjadinya *over* ekspresi enzim xilanolitik oleh *E. coli* rekombinan campuran, namun data yang diperoleh tidak menunjukkan adanya *over* ekspresi produksi enzim xilanolitik dalam media yang mengandung xilan. Hal ini disebabkan karena ekstrak xilan sulit dikonsumsi oleh *E. coli* rekombinan yang memiliki sistem ekspresi intraseluler, sehingga ekstrak xilan tidak dapat terlibat langsung dalam ekspresi enzim xilanolitik dalam sel. *E. coli* rekombinan hanya akan melakukan ekspresi ekstraseluler jika dalam kondisi tanpa adanya gula pereduksi sederhana sebagai sumber karbon dalam media seperti pada media MTM-X. Pada media MTM-X keberadaan ekstrak xilan yang tidak dapat larut sebagai satu-satunya sumber karbon dapat menyebabkan produksi enzim xilanolitik dalam jumlah yang tinggi agar *E. coli* rekombinan campuran dapat melakukan ekspresi secara ekstraseluler di dalam media untuk menunjang pertumbuhan dengan menghidrolisis ekstrak xilan tak larut menjadi xilosa.

Dari data grafik tersebut, dapat diketahui bahwa aktivitas enzim xilanolitik pada berbagai variasi media pada penelitian ini dapat dikatakan rendah, yaitu aktivitas enzim xilanolitik tertinggi yang dihasilkan adalah sebesar 0,0285 U/mL. Rendahnya aktivitas enzim yang dihasilkan disebabkan oleh banyak faktor. Ekstrak xilan yang tidak larut sempurna mengakibatkan ekstrak xilan tidak dapat berperan langsung dalam sistem ekspresi protein intraseluler oleh isolat untuk menginduksi produksi enzim xilanolitik, sehingga enzim diproduksi dalam jumlah yang rendah. *GbtXyl43B* memiliki Carbohidrat Binding Molecule (CBM) yang mampu mempermudah enzim  $\beta$ -xilosidase untuk menghidrolisis substrat xilan

tidak larut. Namun, CBM hanya bekerja pada sistem ekspresi ekstraseluler yang dijalankan oleh bakteri *wild type*, sedangkan pada sistem ekspresi intraseluler oleh bakteri rekombinan CBM tidak dapat bekerja, karena ekstrak xilan tidak larut tidak dapat berperan langsung terhadap sistem ekspresi intraseluler dikarenakan bakteri tidak dapat mengonsumsi molekul ekstrak xilan yang kompleks. Sinergitas dari enzim  $\beta$ -xilosidase dan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase untuk mendergradasi substrat tidak larut dianggap kurang maksimal, oleh karena itu perlu penggabungan lebih dari dua enzim tersebut, yaitu penambahan enzim endo-xilanase yang mampu menghidrolisis rantai utama xilan dari sisi endo menghasilkan xilo-oligosakarida yang ukurannya lebih pendek. Tujuan penambahan enzim endo-xilanase adalah untuk mempercepat hidrolisis substrat xilan, sehingga gula pereduksi yang dihasilkan dalam sama waktu tertentu lebih tinggi dari aktivitas enzim yang terukur menjadi lebih tinggi.

**Tabel 4.1** Data waktu optimum aktivitas enzim xilanolitik, aktivitas optimum enzim xilanolitik, pertumbuhan optimum *E. coli* rekombinan campuran pada media MTM, MTM-X1:3, MTM-X1:1, dan MTM-X

Variasi Media	Waktu Optimum Aktivitas Enzim (Jam)	Aktivitas Optimum Enzim (U/mL)	Puncak Fase Eksponsensial (OD <sub>600</sub> )
MTM	10	0,0285	4,035
MTM-X1:3	10	0,0261	4,635
MTM-X1:1	10	0,0175	5,565
MTM-X	12	0,0196	1,750

Berdasarkan data yang disajikan tabel 4.1, dapat diketahui bahwa enzim xilanolitik yang diproduksi oleh *E. coli* rekombinan campuran pada media yang mengandung ekstrak xilan memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan media MTM yang tidak mengandung xilan. Dengan demikian maka

diasumsikan bahwa ekstrak xilan tidak memiliki peran sebagai induser untuk produksi enzim xilanolitik oleh *E. coli* rekombinan campuran, hal ini disebabkan karena *E. coli* rekombinan memiliki sistem ekspresi intraseluler. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan memperpanjang waktu sampling untuk setiap variasi media agar dapat membuktikan apakah ekstrak xilan dapat berperan sebagai induser untuk produksi enzim xilanolitik dari *E. coli* rekombinan.

Pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran pada media yang mengandung ekstrak xilan dan glukosa (MTM-X1:3 dan MTM-X1:1) memiliki nilai OD<sub>600</sub> lebih tinggi dibandingkan dengan media MTM. Pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran pada media MTM-X yang mengandung ekstrak xilan saja memiliki nilai OD<sub>600</sub> rendah. Dengan demikian dapat diasumsikan bahwa ekstrak xilan dapat digunakan sebagai sumber karbon alternatif campuran dalam media terdefinisi modifikasi. Namun, keberadaan ekstrak xilan dalam media terdefinisi modifikasi harus ditunjang dengan glukosa agar isolat mengonsumsi glukosa terlebih dahulu, sehingga isolat dapat tumbuh dengan baik.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Profil Kurva Pertumbuhan *E. coli* Rekombinan Campuran [*GbtXyl43B*] dan [*abfa51*]
  - a. Media MTM, isolat mengalami fase eksponensial dari jam ke-0 hingga jam ke-8, dan mengalami fase stasioner dari jam ke-8 hingga jam ke-16. Puncak fase eksponensial terjadi pada jam ke-8 dengan nilai OD<sub>600</sub> 4,035.
  - b. Media MTM-X1:3, isolat mengalami fase eksponensial dari jam ke-0 hingga jam ke-8, dan mengalami fase stasioner dari jam ke-8 hingga jam ke-16. Puncak fase eksponensial terjadi pada jam ke-8 dengan nilai OD<sub>600</sub> 4,635.
  - c. Media MTM-X1:1, isolat mengalami fase eksponensial dari jam ke-0 hingga jam ke-8, dan mengalami fase stasioner dari jam ke-8 hingga jam ke-16. Puncak fase eksponensial terjadi pada jam ke-8 dengan nilai OD<sub>600</sub> 5,565.
  - d. Media MTM-X, kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa isolat masih mengalami fase adaptasi yang panjang terhadap media, sehingga perlu penambahan waktu sampling untuk mengetahui fase eksponensial dan fase stasioner yang dialami oleh isolat dalam media ini.
2. Profil Aktivitas Enzim Xilanolitik dalam Berbagai Variasi Media Produksi
  - a. Media MTM, aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dihasilkan pada jam ke-10 dengan nilai aktivitas 0,285 U/mL.

- b. Media MTM-X1:3, aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dihasilkan pada jam ke-10 dengan nilai aktivitas 0,0175 U/mL.
- c. Media MTM-X1:1, aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dihasilkan pada jam ke-10 dengan nilai aktivitas 0,261 U/mL
- d. Media MTM-X, aktivitas enzim xilanolitik tertinggi dihasilkan pada jam ke-10 dengan nilai aktivitas 0,196 U/mL

## 5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut terhadap pertumbuhan *E. coli* rekombinan dan produksi enzim xilanolitik pada setiap variasi media dengan penambahan waktu sampling agar dapat membuktikan peran ekstrak xilan sebagai inducer untuk produksi enzim xilanolitik dari *E. coli* rekombinan. Dan perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai perbandingan penggunaan xilan sebagai media terhadap pertumbuhan *E. coli* rekombinan/campuran dengan bakteri termofilik dari Gunung Pancar Bogor untuk mengetahui sistem ekspresi intraseluler dan ekstraseluler enzim xilanolitik terhadap media xilan.

Pada penelitian ini, ekstrak xilan yang digunakan hanya xilan A, sedangkan xilan B tidak diisolasi dari tongkol jagung. Xilan B merupakan produk sekunder yang mengendap dengan penambahan etanol pada supernatan hasil pengendapan xilan A. Dengan demikian maka xilan B memiliki berat molekul dan derajat polimerisasi yang lebih rendah daripada xilan A, sehingga xilan B seharusnya lebih potensial untuk digunakan sebagai sumber karbon alternatif pada media MTM, karena akan lebih mudah untuk dikonsumsi oleh isolat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ayu, A. K., 2006, Isolasi dan Degradasi Hemiselulosa dari Limbah Tongkol Jagung Secara Enzimatis, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Basar B., Mohd-Shamzi M., Rosfarizan M., Puspaningsih N.N.T., Ariff A.B., 2010, Enhanced Production of Thermophilic Xylanase by Recombinant *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  through Optimization of Medium and Dissolved Oxygen Level, *International Journal of Agriculture & Biology*, Vol. 12, No. 3, Hal. 321-328.
- Black, J. G., 1999, *Microbiology Principle and Exploration*, John Wiley & Sons, Inc. New York, 208-209.
- Cao, J., 2012, Biochemical Characterization of  $\beta$ -Xylan Acting Glycoside Hydrolases from the Thermophilic Bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* Master Test, The School of Engineering, University of Dayton, Ohio.
- Chang, V. S dan Holtzapple M. T. (2000). Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Appl. Biochem Biotechnol* 15-37.
- Collins, T., Gerdley, C., & Feller, G., 2005. Xylanases: Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 29 (1), 3–23.
- Cornelis P. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:456–4.
- Debeche, T., Cummings, N., Connerton, I., Debeire, P., & O'Donohue, M. J., 2000, Genetic and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, **66(4)**, 1734-1736.
- Dodd, D., Mackie, R. I., and Cann, I. K. O., 2011, Xylan Degradation, a Metabolic Property Shared by Rumen and Human Colonic Bacteroidetes, *Molecular Microbiology*, **79(2)**, 292–304.
- Fernandez L. A., Berenguer J., 2000, Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24:21 – 44.
- Graminha, E. B. N., Goncalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Silva, R., Gomes, E., 2008, Enzyme Production by Solid-State Fermentation: Application to Animal Nutrition. *Anim Feed Sci Technol* 144, 1–22.

- Hasenwinkle D, Jervis E, Kops O, Liu C, Lesnicki G, Haynes C, et al., Very high-level production and export in *Escherichia coli* of a cellulose binding domain for use in a generic secretion–affinity fusion system. *Biotechnol Bioeng* 1997;55:854– 63.
- Jordan, D. B., Li, X. L., Dunlap, C. A., Whitehead, T. R., Cotta, M. A., 2007,  $\beta$ -D-Xylosidase From *Selenomonas ruminantium* of Glycoside Hydrolase Family 43. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136-147.
- Knob, A., Terrasan, C. R. F., and Carmona, E. C., 2010,  $\beta$ -Xylosidases from Filamentous Fungi: an Overview. *World J Microbiol Biotechnol*, 26,389–407.
- Kumar, R., Wyman C. E., 2008, Effect of Enzyme Supplementation at Moderate Cellulase Loadings on Initial Glucose and Xylose Release From Corn Stover Solids Pretreated by Leading Technologies, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 102, No. 2, Hal. 457-467.
- Kumar, S., Negi, Y. S., 2012, Corn Cob Xylan-Based Nanoparticles: Ester Prodrug of 5-Aminosalicylic Acid for Possible Targeted Delivery of Drug, *J. Pharm. Sci. & Res*, 4(12).
- Laksa F. O. A., Puspianingsih N. N. T., Sumarsih S., 2012, Pengaruh Enzim Lakase pada Perakuan Awal Amonium Hidroksida dan Hidrogen Peroksida dalam Produksi Bioetanol dari Tongkol Jatiung, Program Studi S1 Kimia, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Li, K., Azadi P., Collins R., Tolaj N., Kim J., and Eriksson, K., 2000, Relationships between Activities of Xylanases and Xylan Structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 89–94
- Lembo T., da Silva R., Pagnocca F. C., Gomes, E., 2001, Production, Characterization, and Properties of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -Xylosidase from a Strain of *Aureobasidium sp*, *Appl Biochem Microbiol* 38:549–552.
- Madigan M.T., dan Martinko J.M., 2006, *Biology of Microorganisms*, Eleventh Edition, Southern Illinois University Carbondale, United States of America : Pearson Education, Inc.
- Makrides S. C., Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1996;60:512– 38.
- Marais, S., 2008, Enzymatic Hydrolysis with Commercial Enzymes of a Xylan Extracted from Hardwood pulp, *Master thesis*, Faculty of Engineering, the Built Environment and Information Technology, University of Pretoria, Pretoria.



- Marlina A., dan Askar S., 2004, Komposisi Kimia Beberapa Bahan Limbah Pertanian dan Industri Pengolahan Hasil Pertanian, Prosiding Temu Teknis Tenaga Fungsional Pertanian, Hal. 99-103.
- Mergulhao, F. J. M., Summers, D. K., Monteiro, G. A., 2005, Recombinant Protein Secretion In *Escherichia coli*, *Biotechnology Advances*, Vol. 23, No. 177-202.
- Meryandini A., Widhyastuti N., Lestari Y., 2008, Pemurnian dan Karakterisasi Xilanase *Streptomyces sp. SKK1-8*, *Makara, Sains*, Vol. 12, No. 2, Hal. 55-60.
- Meyer, H. P., Leist, C., & Fiechter, A., 1984, Acetate formation in continuous culture of *Escherichia coli* K12 D1 on defined and complex media, *Journal of Biotechnology*, 1, 355-358.
- Michelin, M., Simon, C., Nogueira, P., Silva, T. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Teixeira, J. A., Loullas, Polizzi, M. F., T. M., 2012, A Novel Xylan Degrading  $\alpha$ -D-Xylosidase: Purification and Biochemical Characterization, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 3179-3186.
- Millati R., Suroto D. A., Usmiati S., Haliza W., 2009, Produksi Enzim Xilanase dan Penggunaannya untuk Biodegradasi Limbah Jagung Menjadi Xilosa Sebagai Substrat Produksi Xilitol, *Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian Dengan Perguruan Tinggi*.
- Motta F. L., Andrade C. C. P., Santana M. H. A., 2010, A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications, *InTech*, Chapter 10, Hal. 251-275.
- Nicklin, J., Cook, K. G., Pace, T., Kingston, R. A., 1999, *Instant Notes in Microbiology*, Bios, Scientific Publisher UK, 122-128.
- Nigam, J. N., (2002), "Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Hemicellulose Acid Hydrolysate to Motor Fuel Ethanol by XyloseFermenting Yeast", *Journal of Biotechnology*, 97, 107-116.
- Numan, M. T., & Bhose, N. B., (2006),  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: the potential application in biotechnology, *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 33, 247-260.
- Nwodo, U. U., and Okoh, A. I., (2014), Mixed Culture Fermentation and Media Optimization by Response Surface Model: *Streptomyces* and *Brachybacterium* Species in Bioflocculant Production, *molecules*, 19, 1113.
- Polizeli, M., Rizzati, A. C. S., Monthi, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. and D. S. Anorim, 2005, Xylanases from fungi: properties and industrial application, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 65 (5) : p 577-591.

- Puspaningsih, N. N. T., 2004, Pencirian Enzim Xilanolitik dan Kloning Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08, Disertasi Program Studi Biologi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Puspaningsih N. N. T., Suwito H., Sumarsih S., Rohman A., Asmarani O., 2007, Hidrolisis Beberapa Jenis Xilan dengan Enzim Xilanolitik Termofilik Rekombinan, Berk. Penel. Hayati, Vol. 12, Hal. 191-194.
- Puspaningsih N. N. T., Suwanto A., Suhartono M.T., Achmadi S.S., Yogiara, Kimura T., 2008, Cloning, Sequencing and Characterization of The Xylan Degrading Enzymes from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08, Jurnal ILMU DASAR, Vol. 9, No. 2, Hal. 177-187.
- Puspaningsih, N. N. T., 2011, Produksi "Excelzyme" sebagai Bahan Campuran "Biodex" Pendegradasi Bahan Organik, Riset Kerjasama Unair-PT. Pupuk Kaltim, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ratnadewi, A. A. I., 2013, Karakterisasi dan Identifikasi Domain Katalitik dan Domain Pengikat Substrat (Carbohydrate Binding Module)  $\beta$ -xilosidase GbtXyl43B dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08, Disertasi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Renge, V. C., Khedkar, S. V., & Nandurkar, N. R., 2011, Enzyme Synthesis by Fermentation Method: A Review, Sci. Revs. Chem. Commun, 2(4), 585-590.
- Richana N., 2002, Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia, Bulan AgroBio, Vol. 5, No.1, Hal. 29-36.
- Richana N., Irawadi T. T., Nur M. A., Salim I., Syamsu K., Arkenan Y., 2007, Ekstraksi Xilan dari Tongkol Jagung, Jurnal Pascapanen, Vol.4, No.1, Hal 38-43.
- Richana N., Irawadi T. T., Nur A., Syamsu K., 2008, Isolasi Identifikasi Bakteri Penghasil Xilanase serta Karakterisasi Enzimnya, Jurnal AgroBiogen, Vol. 4, No.1, Hal. 24-34.
- Saha, B. C., 2000,  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology, Biotechnology Advances, 8, 403-423.
- Saha B. C., 2003, Hemicellulose Bioconversion, J Ind Microbiol Biotechnol, Vol. 30, Hal. 279-291.
- Septiningrum K., dan Apriana P. C., 2011, Produksi Xilanase dari Tongkol Jagung dengan Sistem Bioproses Menggunakan *Bacillus Circulans* untuk Pra-Pemutihan Pulp, Jurnal Riset Industri, Vol. 5, No. 1, Hal. 87-97.

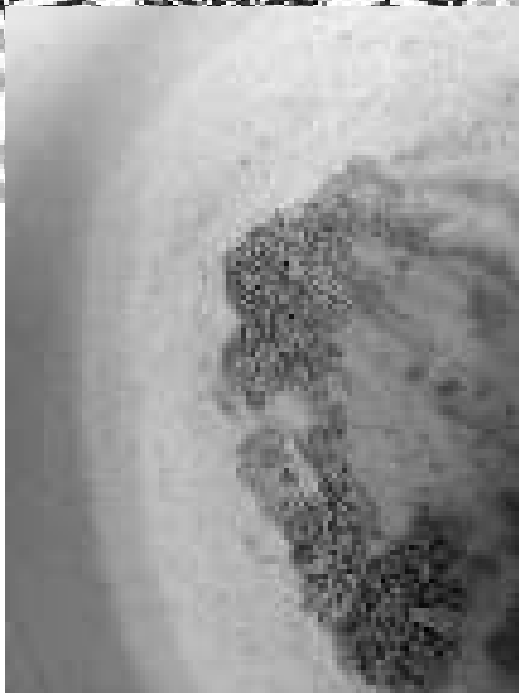
- Shao, W., Xue, Y., Wu, A., Kataeva, I., Pei, J., Wu, H., Wiegel, J., 2011, Characterization of a Novel  $\beta$ -Xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485, *Appl Environ Microbiol*, 77(3), 719-726.
- Sharshar, K. M and E. A Azab. 2008. Studies on diseased freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* infected with *Vibrio vulnificus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (17): 2092-2100.
- Singleton, P. and D. Sainsbury, 2001, *Dictionary of Biology and Molecular Biology*, 3th edition, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester West Sussex PO19 1UD, UK, 70- 72, 679.
- Subramaniyan, S., & Prema, P., 2002, *Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 33-46.
- Sutarma, 2000, *Kultur Media Bakteri – Lima Teknik Fungsional non Peneliti*.
- Tan, I., 1999, *Characterization of Thermophilic Bacterium Producing Xylanolytic Enzyme from Hot Spring Gunung Panca, Bogor* (in Bahasa Indonesia), Master Thesis, Institut Pertanian Bogor, Indonesia.
- Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F. W., Barough, J. E., 1991, Hagan and Bruner's *Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. 8<sup>th</sup> ed, Comstock Publishing Associates, A Division Cornell University Press, Ithaca and London, 24-30.
- Trismillah dan Lutfi, 2009, Pengaruh pH terhadap proses Ultrafikasi Xilanase. *Jurnal Sains Dan Teknologi Indonesia*, 11 (2): 76-83.
- Trismilah, dan Waltam D. R., 2009, Produksi Xilanase Menggunakan Media Limbah Pertanian dan Perkebunan, *J. Tek. Ling*, Vol. 10, No. 2, Hal. 137-144.
- Umiyasih U., dan Wina E., 2008, Pengolahan dan Nilai Nutrisi Limbah Tanaman Jagung sebagai Pakan Ternak Ruminansia, *Wartazoa*, Vol. 18, No. 3, Hal. 127-136.
- Wirajana, I. N., Wasito E. B., Kusuma H. M. S. E., Puspaningsih N. N. T., 2010, Subkloning Gen -L-Arabinofuranosidase (*abfA*) Dalam Vektor Ekspresi pYES2, *Jurnal Kimia*, Vol. 4, No. 2, Hal 149-157.
- Wong, K. K., Tan, L. U., & Saddler, J. N., 1988, Multiplicity of  $\beta$ -1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiological Reviews*, 52, 305-317.

## LAMPIRAN

### 1. Isolasi Xilan dari Tongkol Jagung



Lampiran 1.1 Proses ekstraksi xilan dari tongkol jagung



Lampiran 1.2 Ekstrak xilan dari tongkol jagung



**Lampiran 1.3** Proses pengendapan xilan dengan penambahan asam asetat 4N

## **2. Pembuatan Media Produksi**



**Lampiran 2.1** Pembuatan media alternatif mengandung ekstrak xilan

### 3. Pertumbuhan *E. coli* rekombinan campuran



**Lampiran 3.1** Proses sampling untuk uji OD<sub>600</sub> dan uji aktivitas enzim

JAM KE	ABSORBANSI		FP	OD600	SD	BLANKO	ABSORBANSI	
	A	B					A	B
0	0,101	0,111	5	0,519	0,008485281	0,405	0,506	0,518
2	0,572	0,583	5	2,33	0,028991278	0,405	0,977	0,936
4	0,756	0,761	5	3,625	0,003515532	0,405	1,161	1,166
6	5,545	5,535	4	5,31	0,007071068	2,025	7,57	7,56
8	5,415	5,605	1	5,58	0,134350288	2,025	7,44	7,63
10	5,755	5,375	1	5,4	0,268700577	2,025	7,78	7,4
12	5,875	5,725	1	5,8	0,106066017	2,025	7,9	7,75
14	6,005	5,785	1	5,895	0,155563492	2,025	8,03	7,81
16	5,265	5,205	1	5,235	0,042426407	2,025	7,29	7,23

**Lampiran 3.2** Data absorbansi dengan pengukuran OD<sub>600</sub> *E. coli* rekombinan campuran pada media MTM-X1:1

JAM KE	ABSORBANSI		FP	OD600	SD	BLANKO	ABSORBANSI	
	A	B					A	B
0	0,082	0,008	5	0,225	0,052325902	0,153	0,235	0,161
2	0,483	0,449	5	2,33	0,024041631	0,153	0,636	0,602
4	0,744	0,705	5	3,6225	0,027577164	0,153	0,897	0,858
6	0,882	0,823	5	4,2625	0,0417193	0,153	1,035	0,976
8	4,585	4,685	1	4,635	0,070710678	0,765	5,35	5,45
10	4,395	4,765	1	4,58	0,261629509	0,765	5,16	5,53
12	4,235	4,585	1	4,41	0,247487373	0,765	5	5,35
14	4,775	4,635	1	4,705	0,098994949	0,765	5,54	5,4
16	4,945	4,815	1	4,88	0,091923882	0,765	5,71	5,58

**Lampiran 3.3** Data absorbansi dengan pengukuran OD<sub>600</sub> *E. coli* rekombinan campuran pada media MTM-X1:3

jam ke	Abs		FP	OD600	SD
	A	B			
0	0,136	0,174	1	0,155	0,02687
2	1,063	1,071	1	1,067	0,005657
4	2,351	2,365	1	2,358	0,009899
6	0,719	0,718	5	3,593	0,000707
8	0,389	0,418	10	4,035	0,020506
10	0,374	0,405	10	3,895	0,02192
12	0,420	0,423	10	4,215	0,002121
14	0,424	0,397	10	4,105	0,019092
16	0,382	0,402	10	3,920	0,014142

**Lampiran 3.4** Data absorbansi dengan pengukuran OD<sub>600</sub> *E. coli* rekombinan campuran pada media MTM-X

JAM KE	KONTROL	ABSORBANSI		FP	SD	ABSORBANSI AKHIR		OD
		A	B			A	B	
0	0,139	0,186	0,185	10	0,056568	0,47	0,47	0,47
2	0,139	0,205	0,225	10	0,056568	0,66	0,86	0,76
4	0,139	0,214	0,288	10	0,056568	0,75	1	0,875
6	0,139	0,237	0,291	10	0,056568	1,18	1,52	1,35
8	0,139	0,185	0,193	10	0,056568	0,46	0,54	0,5
10	0,139	0,264	0,197	10	0,056568	1,25	0,58	0,915
12	0,139	0,315	0,304	10	0,077162	1,76	1,65	1,705
14	0,139	0,265	0,277	10	0,084883	1,26	1,38	1,32
16	0,139	0,327	0,301	10	0,183848	1,88	1,62	1,75

**Lampiran 3.5** Data absorbansi dengan pengukuran OD<sub>600</sub> *E. coli* rekombinan campuran pada media MTM-X

#### 4. Uji Aktivitas Enzim Xilanolitik

JAM	ABORBANSI			KONSENTRASI PRODUK			PRODUK		AKTIVITAS		RATA-RATA
	K	A	B	K	A	B	A	B	A	B	
6	0,415	0,442	0,444	0,1280	0,1345	0,1350	0,0066	0,0070	0,0117	0,0125	0,0121
10	0,291	0,349	0,365	0,0979	0,1120	0,1158	0,0141	0,0180	0,0250	0,0319	0,0285
12	0,506	0,531	0,549	0,1501	0,1561	0,1605	0,0061	0,0104	0,0108	0,0186	0,0147

**Lampiran 4.1** Data absorbansi uji aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM

JAM	ABORBANSI			KONSENTRASI PRODUK			PRODUK		AKTIVITAS		RATA-RATA
	K	A	B	K	A	B	A	B	A	B	
6	0,295	0,331	0,337	0,0988	0,1076	0,1090	0,0087	0,0102	0,0155	0,0181	0,0168
10	0,279	0,322	0,317	0,0950	0,1054	0,1042	0,0104	0,0092	0,0186	0,0164	0,0175
12	0,321	0,356	0,336	0,1052	0,1137	0,1088	0,0085	0,0036	0,0151	0,0065	0,0108

**Lampiran 4.2** Data absorbansi uji aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X1:3

JAM	ABORBANSI			KONSENTRASI PRODUK			PRODUK		AKTIVITAS		RATA-RATA
	K	A	B	K	A	B	A	B	A	B	
6	0,237	0,258	0,252	0,0848	0,0899	0,0884	0,0051	0,0036	0,0091	0,0065	<b>0,0078</b>
10	0,415	0,468	0,483	0,1280	0,1408	0,1445	0,0129	0,0165	0,0229	0,0293	<b>0,0261</b>
12	0,448	0,522	0,492	0,1360	0,1540	0,1467	0,0180	0,0107	0,0319	0,0190	<b>0,0255</b>

**Lampiran 4.3** Data absorbansi uji aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X 1:1

JAM	ABORBANSI			KONSENTRASI PRODUK			PRODUK		AKTIVITAS		RATA-RATA
	K	A	B	K	A	B	A	B	A	B	
6	0,595	0,64	0,633	0,1717	0,1826	0,1809	0,0109	0,0092	0,0194	0,0164	<b>0,0179</b>
10	0,566	0,639	0,57	0,1646	0,1824	0,1656	0,0177	0,0010	0,0315	0,0017	<b>0,0166</b>
12	0,443	0,492	0,485	0,1348	0,1467	0,1450	0,0119	0,0102	0,0211	0,0181	<b>0,0196</b>

**Lampiran 4.4** Data absorbansi uji aktivitas enzim xilanolitik pada media MTM-X

## 5. Pembuatan Reagen Asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS)

Sebanyak 4 gram NaOH dilarutkan 60 mL akuades kemudian ditambahkan 18,2 gram Kalium Natrium Tatriat, 1 gram asam dinitrosalisilat (ditambahkan pelan-pelan sambil diaduk dengan magnetic stirrer), 0,05 gram natrium sulfat dan 0,2 gram fenol. Kemudian ditambahkan akuades hingga memiliki volume 100 mL. Semua bahan pembuatan reagen DNS dimasukkan secara urut satu per satu sesuai urutan.

## 6. Pembuatan Buffer Fosfat Sitrat 50 mM pH 6

100 mL buffer fosfat sitrat pH 6

A: 0,1 M asam sitrat (1,921 gram dalam 100 mL)

B: 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5,365 gram dalam 100 mL)

Untuk mendapatkan buffer fosfat sitrat pH 6, 53,7 mL larutan A dicampur dengan 96,3 mL larutan B. Kemudian diencerkan hingga memiliki volume 300 mL. Buffer fosfat sitrat pH 6 dengan formulasi ini memiliki konsentrasi 80 mM.



Untuk mendapatkan buffer fosfat sitrat 50 mM pH 6, dilakukan pengenceran sebagai berikut :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$300 \text{ mL} \times 80 \text{ mM} = V_2 \times 50 \text{ mM}$$

$$V_2 = 480 \text{ mL}$$

Sehingga untuk mendapatkan buffer fosfat sitrat 50 mM pH 6, 300 mL buffer fosfat sitrat 80 mM pH 6 dilakukan pengenceran hingga memiliki volume 480 mL.

#### 7. Pembuatan Ampisilin 100 mg/mL

Sebanyak 10 gram ampisilin dilarutkan dalam 10 mL akuades steril. Untuk penyimpanan larutan ampisilin diadkuat dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 8. Pembuatan Substrat *Beechwood* 1%

Sebanyak 0,5 gram *beechwood* dilarutkan dengan 50 mL buffer fosfat sitrat 50 mM pH 6, kemudian di *autoclave*.

#### 9. Pembuatan Larutan Standar Xilosa

Sebanyak 100 mg xilosa dilarutkan pada 50 ml akuades agar konsentrasinya menjadi 2 mg/mL. Kemudian dari konsentrasi ini dibagi menjadi 8 konsentrasi lagi untuk diuji sebagai standar. Menggunakan rumus  $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$  dapat diketahui masing volume dari 8 perbedaan konsentrasi. Variasi standar yang digunakan ialah 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,8 mg/mL.

